

**CLONACIÓN DEL ADN COMPLEMENTARIO DE IDURONATO  
2-SULFATO SULFATASA HUMANA RECOMBINANTE SIN LA  
SECUENCIA QUE CODIFICA PARA EL PÉPTIDO SEÑAL NATIVO,  
EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pPIC9**

**CLAUDIA MARCELA RIVERA HOYOS**



**"GECAVYME"**  
Grupo de Investigación en  
Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas  
Laboratorio de Bioquímica y Genética



**UNIVERSIDAD  
DEL QUINDÍO**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
ARMENIA (QUINDÍO)  
DICIEMBRE DE 2008**

**CLONACIÓN DEL ADN COMPLEMENTARIO DE IDURONATO  
2-SULFATO SULFATASA HUMANA RECOMBINANTE SIN LA  
SECUENCIA QUE CODIFICA PARA EL PÉPTIDO SEÑAL NATIVO,  
EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pPIC9**

**CLAUDIA MARCELA RIVERA HOYOS**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de

**BIÓLOGO**

**DIRECTOR**

**EDWIN DAVID MORALES ÁLVAREZ, Quim., MSc.**

Universidad del Quindío

Grupo de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas  
Programas de Biología y Maestría en Ciencias Biomédicas

**CO-DIRECTOR**

**PATRICIA LANDÁZURI, MSc., PhD.**

Universidad del Quindío

Grupo de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas  
Programa de Maestría en Ciencias Biomédicas

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
ARMENIA (QUINDÍO)  
DICIEMBRE DE 2008**

## **NOTA DE ACEPTACIÓN**

El trabajo de grado titulado “**CLONACIÓN DEL ADN COMPLEMENTARIO DE IDURONATO 2-SULFATO SULFATASA HUMANA RECOMBINANTE SIN LA SECUENCIA QUE CODIFICA PARA EL PÉPTIDO SEÑAL NATIVO, EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pPIC9**”, presentado por la estudiante **CLAUDIA MARCELA RIVERA HOYOS**, como requisito parcial para optar al título de Biólogo, fue revisado y calificado como:

**APROBADO**

---

Edwin David Morales Álvarez Quim., MSc.  
**Director**

---

Patricia Landázuri MSc., PhD.  
**Co-Directora**

**Armenia (Q), Diciembre 2 de 2008**

## **NOTA DE APROBACIÓN**

---

---

---

---

**Raúl Alberto Poutou Piñales MSc., PhD**  
**Jurado**

---

**Jhon Carlos Castaño Osorio MD., PhD.**  
**Jurado**

---

**Leonardo Padilla Sanabria Bact., MSc.**  
**Jurado**

**Armenia (Q), Diciembre 2 de 2008**

*A mis padres: Barney y Dora,  
Quienes son mi fuerza y mi razón de ser...  
A ellos les debo todo lo que soy.*

## AGRADECIMIENTOS

*Tengo tantas personas y tanto que agradecer, que las palabras se tornan irrelevantes para realmente expresar mi eterna gratitud:*

*A David, por su paciencia, enseñanzas, tiempo, amistad y cariño. Por confiar ciegamente en mi trabajo y porque siempre que necesité de él me brindó su apoyo incondicional.*

*A Nelsy le agradezco por ser una gran Maestra, por creer en mí, por brindarme su confianza y sobre todo por su amistad.*

*A la Dra. Landázuri por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo y por valorar mi trabajo en él.*

*Al Biólogo Harold Suarez por ser el ángel de mi tesis y porque me brindó su ayuda desinteresadamente a pesar de sus responsabilidades. Pero sobre todo por ser un gran amigo, por compartir tantos momentos y por crecer juntos como estudiantes y como personas.*

*A Andres Felipe Arias, por recorrer junto a mí este largo camino. Por alegrarse con mis triunfos y acompañarme en mis fracasos.*

*A todos los integrantes de GECAYME, porque sin excepción alguna han estado involucrados en el desarrollo de éste proyecto y en especial a Mélida, Aleja y Martica por sus constantes demostraciones de afecto.*

*A GYMOL, en especial a Maria, Tellez, el Dr. Jhon Carlos y Leonardo por el apoyo logístico, académico y porque en ellos encontré calidez y confianza.*

*A mis compañeras de Grupo en el laboratorio, Daiana y Angélica, porque de ellas aprendí mucho, porque siempre se mostraron interesadas en mi trabajo y por valorar mis sugerencias y opiniones.*

*A todos los profesores que hicieron parte de mi formación como Bióloga en el transcurso de la carrera por todas sus enseñanzas, pero sobre todo a los que además hicieron parte de mi formación como persona: A Nelsy (nuevamente), Fredy Molano, la Dra. Carvajal, Ana María, Rocío Suarez y Víctor.*

*Al Laboratorio de Biología, en especial a Paula Bedoya por ofrecerme su ayuda y amistad.*

*A Dianita y Arlés por preocuparse tanto por mí, por colaborarme siempre que estuviera al alcance de sus manos y por sus constantes demostraciones de afecto.*

*A mis compañeros de estudio por su paciencia, tolerancia y afecto a pesar de tantos obstáculos. En especial a Lina Londoño, Andres Castro, Lorena García, Johny Valencia, Juan Felipe, Alejandro y Hernando porque me brindaron su amistad y, algunos de ellos, con el paso del tiempo se han convertido en grandes amigos y se han fortalecido los lazos que nos unen. A ellos ¡mil gracias!*

*A Sandra Coronado y Aylan Arenas porque me brindaron su ayuda de forma desinteresada siempre que tuve una pregunta o necesité apoyo logístico. ¡Muchas gracias!*

*Finalmente, a Faber Mosquera, Jockny Martinez y Sebastián Aguirre por ser tan buenos amigos y demostrarme siempre su afecto y confianza... A ellos también les debo mi trabajo.*

***¡NUEVAMENTE GRACIAS A TODOS!***

## RESUMEN

La Mucopolisacaridosis tipo II es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X causada por la deficiencia de la enzima lisosomal Iduronato-2-Sulfato Sulfatasa (IDS), llevando a la acumulación de glicosaminaoglicanos en tejidos y órganos. En el intento por desarrollar técnicas de expresión más económicas para el tratamiento con Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE) se ha expresado IDS<sub>hr</sub> en modelos como la bacteria *E. coli* y la levadura *P. pastoris*. Sin embargo, en las construcciones de los vectores recombinantes aparecen dos secuencias de péptido señal al mismo tiempo (la nativa y la putativa de *S. cerevisiae*), y se ha pensado en la posibilidad de un conflicto en el reconocimiento erróneo de una u otra señal de secreción con consecuencias en la expresión así como en la actividad enzimática. Con el fin de lograr avances en el mejoramiento de los sistemas de expresión se realizó una nueva clonación del ADN complementario de IDS<sub>hr</sub> en el vector pPIC9, eliminando la secuencia que codifica para el péptido señal nativo por medio de la amplificación por PCR. La secuenciación de la IDS obtenida mostró una alta identidad al realizar con ClustalW un alineamiento múltiple con la secuencia reportada en GeneBank para la IDS. El vector recombinante obtenido (pPIC9-hIDS) abre nuevos caminos en la búsqueda de formas más económicas y eficientes para la producción de IDS<sub>hr</sub> recombinante para el tratamiento del síndrome de Hunter con TRE.

**Palabras clave:** Síndrome de Hunter, Iduronato-2-Sulfato Sulfatasa, Subclonación, Péptido señal Nativo, Terapia de Reemplazo Enzimático.

## ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type II is an X-linked recessive disease caused by the lysosomal enzyme Iduronate-2-sulphatase deficiency, leading to progressive accumulation of glycosaminoglycans in tissues and organs. Attempting to develop more economic expression techniques for the treatment using Enzymatic Replacement Therapy (ERT), hrIDS has been expressed in different models such as *E. coli* and *P. pastoris*. However, in the recombinant vectors appears two sequences of signal peptide at the same time (the native and putative one from *S. cerevisiae*), and it has been thought about the possibility of a conflict because of the wrong recognition of one or another secretion signal with consequences not only in the expression but also in the enzymatic activity. Looking for advances in the improvement of the expression systems, a new DNA complementary cloning system for hIDS in the pPIC9 vector was done, eliminating the native signal peptide through PCR amplification. Obtained IDS sequencing showed a high identity after carrying out a multiple alignment by ClustalW with the GeneBank reported sequence for IDS. The recombinant vector (pPIC9-hIDS) opens new roads in the search of more economic and efficient ways for recombinant hIDS production for Hunter syndrome treatment using ERT.

**Key words:** Hunter syndrome, Iduronate-2-sulphatase, Subclonation, Native Signal Peptide, Enzymatic Replacement Therapy.

# CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>3</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>5</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
4.1 OBJETIVO GENERAL	6
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
<b>5. MARCO TEÓRICO</b>	<b>7</b>
5.1 ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO	7
5.2 ENFERMEDADES DE DEPÓSITO LISOSOMAL	8
5.3 MUCOPOLISACARIDOSIS	9
5.3.1 Mucopolisacaridosis tipo II o Síndrome de Hunter	11
5.3.1.1 Manifestaciones clínicas	11
5.4 IDURONATO 2-SULFATO SULFATASA HUMANA	12
5.4.1 Estructura del gen de la Iduronato 2-Sulfato Sulfatasa	15
5.4.2 Estructura terciaria de la IDShr con la secuencia del péptido señal	16
5.5 TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DE HUNTER	19
5.6 TERAPIA DE REEMPLAZO ENZIMÁTICO PARA ENFERMEDADES LISOSOMALES	21
5.7 pPIC9 COMO VECTOR DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	22
5.7.1 Señal de secreción Péptido $\alpha$ -Factor ( $\alpha$ -MF)	23
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
6.1 MICROORGANISMOS	24

6.1.1 <i>Escherichia coli</i>	24
6.2 CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS	24
6.3 PLÁSMIDOS	24
6.3.1 pUC13-IDS	24
6.3.2 pGEM-T <i>Easy</i>	25
6.3.3 pPIC9	26
6.4 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS	26
6.5 OBTENCIÓN DEL ADNc DE LA IDS SIN PÉPTIDO SEÑAL NATIVO	27
6.5.1 Restricción de pUC13-IDS	27
6.5.2 Amplificación por PCR del ADNc de la IDS sin péptido señal nativo	27
6.6 SUBCLONACIÓN DEL ADNc DE hIDS	28
6.7 TRANSFORMACIÓN DE <i>Escherichia coli</i>	29
6.7.1 <i>Escherichia coli</i> competentes	29
6.7.2 Transformación de <i>Escherichia coli</i> competentes	30
6.8 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN pPIC9-hIDS	30
6.8.1 Preparación del vector (pPIC9) y el inserto (ADNc de hIDS)	30
6.8.2 Ligación de hIDS con pPIC9	31
6.9 EVALUACIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE	31
6.10 SECUENCIACIÓN DE hIDS	32
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
7.1 OBTENCIÓN DEL ADNc DE LA hIDS	33
7.1.1 Restricción de pUC13-IDS	33
7.1.2 Obtención del fragmento de IDS sin péptido señal nativo	35
7.2 SUBCLONACIÓN DEL ADNc de hIDS	37
7.2.1 Ligación del fragmento de hIDS al vector pPIC9	41
7.3 SECUENCIACIÓN DE hIDS	44
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>9. RECOMENDACIONES</b>	<b>48</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>54</b>

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Cebadores utilizados para amplificar el ADNc de la IDS sin la secuencia que codifica para el péptido señal nativo	<b>28</b>
<b>Tabla 2.</b> Eficiencia de las enzimas de restricción para cortar los productos de PCR con sitios de reconocimiento en los extremos de los fragmentos	<b>37</b>
<b>Tabla 3.</b> Comparación de las propiedades de los productos de PCR generados con algunas ADN polimerasas termoestables	<b>38</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Mecanismo patogénico en los Errores Innatos del Metabolismo	7
<b>Figura 2.</b> Vía de degradación del Dermatán Sulfato	10
<b>Figura 3.</b> Homología parcial de la secuencia de aminoácidos de las sulfatasas de distintos grupos de organismos	12
<b>Figura 4.</b> Transformación del residuo Cisteína a Formilglicina	13
<b>Figura 5.</b> Secuencia de aminoácidos de la IDSh y sitios potenciales de N-Glicosilación	14
<b>Figura 6.</b> Esquema del procesamiento de la IDS	15
<b>Figura 7.</b> Cromosoma X humano	15
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática del gen de la IDS	16
<b>Figura 9.</b> Posibles alteraciones de la secreción causadas por la presencia del péptido señal nativo en la IDSh	17
<b>Figura 10.</b> Modelo de la estructura terciaria de IDSh conteniendo el péptido señal nativo	18
<b>Figura 11.</b> Esquema del plásmido de expresión pPIC9	22
<b>Figura 12.</b> Esquema del vector recombinante pUC13-IDS	25
<b>Figura 13.</b> Vector de clonación pGEM-T <i>Easy</i>	26
<b>Figura 14.</b> Restricción virtual de pUC13-IDS con <i>EcoRI</i>	33
<b>Figura 15.</b> Electroforesis de la restricción de pUC13-IDS con <i>EcoRI</i> en gel de agarosa al 1%	34
<b>Figura 16.</b> Secuencias teóricas del producto de restricción y del producto de PCR	35
<b>Figura 17.</b> Producto de amplificación por PCR del ADNc de la IDS sin la secuencia que codifica para el péptido señal nativo (hIDS)	36
<b>Figura 18.</b> Características de los extremos del producto de PCR	39

<b>Figura 19.</b> Resultado de la transformación de <i>E. coli</i> DH5α con el constructo pGEM-T Easy-hIDS	<b>39</b>
<b>Figura 20.</b> Electroforesis de pGEM-T Easy-hIDS y restricción con <i>XhoI</i> y <i>NotI</i>	<b>40</b>
<b>Figura 21.</b> Sitios de restricción con <i>NotI</i> de pGEM-T Easy-hIDS	<b>41</b>
<b>Figura 22.</b> Resultado de la transformación de <i>E. coli</i> DH5α con el constructo pPIC9-hIDS	<b>42</b>
<b>Figura 23.</b> Producto de extracción de pPIC9-hIDS	<b>43</b>
<b>Figura 24.</b> Restricción del constructo pPIC9-hIDS con las enzimas <i>XhoI</i> y <i>NotI</i>	<b>44</b>
<b>Figura 25.</b> Alineamiento de la secuencia parcial de hIDS con la IDS reportada en el GeneBank	<b>45</b>
<b>Figura 26.</b> Esquema propuesto del vector recombinante pPIC9-hIDS	<b>46</b>

## INTRODUCCIÓN

La mucopolisacaridosis tipo II (MPS II), o Síndrome de Hunter, es una enfermedad hereditaria de almacenamiento lisosomal, de transmisión recesiva ligada al cromosoma X<sup>1</sup>. Es causada por la deficiencia de la enzima Iduronato 2-Sulfato Sulfatasa (IDS), llevando a la acumulación en los tejidos de los mucopolisacáridos heparán y dermatán sulfato, con excreción urinaria de los mismos; hecho que ha sido empleado para el diagnóstico de la enfermedad<sup>2</sup>.

En esta enfermedad, como en otros errores innatos del metabolismo (EIM), el defecto se halla a nivel del gen que codifica para la enzima, resultando en una patología intratable por métodos convencionales<sup>3</sup>. Históricamente, el manejo de la MPS II se ha dirigido a la corrección de las manifestaciones clínicas mediante el uso de audífonos y terapia ortopédica. Una de las alternativas propuestas en los últimos años para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal es la Terapia de Reemplazo enzimático (TRE), la cual ha mostrado la posibilidad de revertir las complicaciones viscerales en enfermedades como el Síndrome de Hunter<sup>4,5</sup>.

En este sentido, la búsqueda de nuevas soluciones terapéuticas ha permitido proporcionar a los pacientes la enzima IDS activa mediante TRE. Actualmente, se ofrece la enzima recombinante *Elaprase*<sup>™</sup>, la cual se produce en una línea de células humanas<sup>4</sup>. Así mismo, la TRE ha mostrado efectividad en otros desórdenes metabólicos como las enfermedades de Gaucher, Fabry, Hurler, Maroteaux-Lamy y Pompe<sup>6</sup>. Sin embargo, para la TRE es necesario el desarrollo de técnicas de expresión de proteínas recombinantes donde se utilicen modelos más económicos que las líneas celulares humanas.

Así, la utilización de sistemas de expresión de menor costo como la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) y la levadura *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) abre nuevos horizontes para continuar explorando estrategias para el tratamiento de la MPS II entre otras.

En un trabajo previo, se construyó un vector recombinante para la producción de IDS humana recombinante (IDShr-*Like*) en *P. pastoris* (constructo GS115/pPIC9-IDShr-*Like*) donde se obtuvieron expresiones hasta de ~30mmol/h/mg de proteína<sup>7</sup>. Sin embargo, se halló que en la construcción del vector recombinante aparecen dos secuencias de péptido señal al mismo tiempo, la nativa de la IDS humana (IDSh) y la putativa proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*).

Teniendo en cuenta que en *P. pastoris* varias proteínas recombinantes han sido secretadas con un rendimiento dos o tres veces mayor utilizando el péptido señal de levadura ( $\alpha$ -MF, *PHO1* ó *SUC2*) en vez del péptido señal nativo heterólogo<sup>8,9,10</sup>; se pensó en la posibilidad de un conflicto en el reconocimiento erróneo de una u otra señal de secreción en el caso de la construcción GS115/pPIC9-IDS.

Según lo expuesto anteriormente, este trabajo tiene como objetivo lograr avances en el mejoramiento del sistema de expresión de la IDShr en *P. pastoris* con miras al tratamiento del Síndrome de Hunter, realizando una nueva clonación del ADN complementario (ADNc) de IDSh sin la secuencia que codifica para el péptido señal nativo en el vector de expresión pPIC9, de forma que en un futuro pueda realizarse un estudio comparativo de la expresión de IDShr en *P. pastoris* con las construcciones genéticas anteriores.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las alternativas propuestas en los últimos años para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal es la TRE, la cual ha mostrado la posibilidad de revertir las complicaciones viscerales en enfermedades como el Síndrome de Hunter<sup>5,4</sup>. El objetivo de esta terapia es proporcionarle al paciente la enzima purificada de origen exógeno, con la intención de que ésta llegue a los tejidos en los cuales es necesaria su actividad; por lo tanto la enzima debe obtenerse en cantidades suficientes, no antigénica y con alta actividad específica<sup>11</sup>.

Por esta razón, desde hace varios años se vienen desarrollando estrategias conjuntas por parte del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM) de la Universidad Javeriana y el Grupo de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas (GECAVYME) de la Universidad del Quindío para contribuir al tratamiento de distintas MPS por medio de la producción de proteínas recombinantes. Dentro de las estrategias desarrolladas por estos grupos para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, se encuentra la de optar por la secreción de la proteína de interés hacia el medio extracelular, ya que la recuperación de la molécula desde el medio de cultivo representa un primer paso en el proceso de purificación. Para esto, se han utilizado vectores de expresión como el pPIC9 que contienen una señal de secreción que envía la proteína al exterior de las células<sup>12</sup>.

Aún así, tras la construcción del vector recombinante GS115/pPIC9-IDShr-*Like* en un trabajo realizado entre el IEIM y GECAVYME, se encontraron dos secuencias de péptido señal al mismo tiempo, la nativa de la IDS humana (IDSh) y la putativa proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)<sup>7</sup>, por lo que se pensó en la posibilidad de un conflicto en el reconocimiento erróneo de una u otra señal de secreción en el caso de dicha construcción.

Por este motivo, en el año 2005 se realizó un trabajo de tesis doctoral tomando los resultados obtenidos con el constructo GS115/pPIC9-IDShr-*Like*, con el fin de lograr avances en el modelo computacional de la estructura de la IDSh y en los procesos de expresión y purificación de la proteína recombinante expresada en *P. pastoris* y *E. coli* para la producción de mayores cantidades de enzima activa para su uso en TRE.

En dicho trabajo, el modelo computacional de la estructura terciaria de la IDSh adicionándole el péptido señal nativo, mostró claramente que estos residuos afectan la estructura de la enzima, pues parte de la secuencia cubre la entrada al bolsillo de la proteína recombinante, constituyendo un impedimento para la formación del complejo enzima sustrato. Aunque en dicho trabajo la enzima recombinante presentó niveles de actividad de hasta 4 y 9 veces los presentes en plasma y leucocitos humanos, no se consideró óptimo para obtener cantidades clínicamente útiles<sup>13</sup>.

Si se tiene en cuenta lo expuesto anteriormente, es claro que se debe emprender una nueva clonación de la IDShr sin el péptido señal heterólogo o nativo en el vector pPIC9, para en un futuro realizar comparaciones en el nivel de expresión de la enzima con respecto a los constructos anteriores.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Teniendo en cuenta que la eficiencia en el proceso de exportación de una proteína recombinante desde el retículo endoplásmico (RE) al medio extracelular es una etapa fundamental para el nivel de expresión, es posible que el péptido señal heterólogo de la IDSh no sea reconocido ni procesado por la levadura. Debido a que la función de la señal de secreción está directamente relacionada con el paso del polipéptido nascente a través de la membrana del RE y la interacción con las moléculas de la vía de secreción<sup>14</sup>, es de esperar un mejor reconocimiento y procesamiento de la señal de secreción cuando ésta proviene de otra levadura. Por lo tanto, expresar proteínas heterólogas humanas en levaduras utilizando el péptido señal de otras levaduras favorece el procesamiento correcto del mismo, la interacción con las proteínas auxiliares del RE para la formación de puentes disulfuro, y el plegamiento y transporte por la vía de secreción<sup>14</sup>.

Es por esto que de no presentarse un procesamiento correcto de la proteína cuando es sintetizada, precedida de su secuencia señal nativa, podría estarse generando una proteína que sea inestable termodinámicamente y susceptible de ser empleada como fuente de aminoácidos al ser digerida por las proteasas intracelulares. Lo que evidentemente afectaría la recuperación de la proteína de interés en el medio extracelular como resultado de una baja o nula expresión<sup>8</sup>.

Hasta el momento no existen mecanismos para predecir si la señal de secreción putativa proveniente de la levadura *S. cerevisiae* ( $\alpha$ -MF) proporciona los mejores niveles de secreción para enzimas como la IDShr, aunque teniendo en cuenta los reportes bibliográficos, podría esperarse un incremento en la secreción de la enzima. Aún así, es necesario realizar un nuevo constructo pPIC9/IDSh en el que se elimine la secuencia que codifica para el péptido señal heterólogo o nativo de IDSh, para en un futuro realizar comparaciones en el nivel de expresión de IDSh en la levadura *Pichia pastoris*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

- Clonar el ADN complementario (ADNc) de la Iduronato 2-Sulfato Sulfatasa Humana (IDSh) sin la secuencia que codifica para el péptido señal nativo, en el vector de expresión pPIC9.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

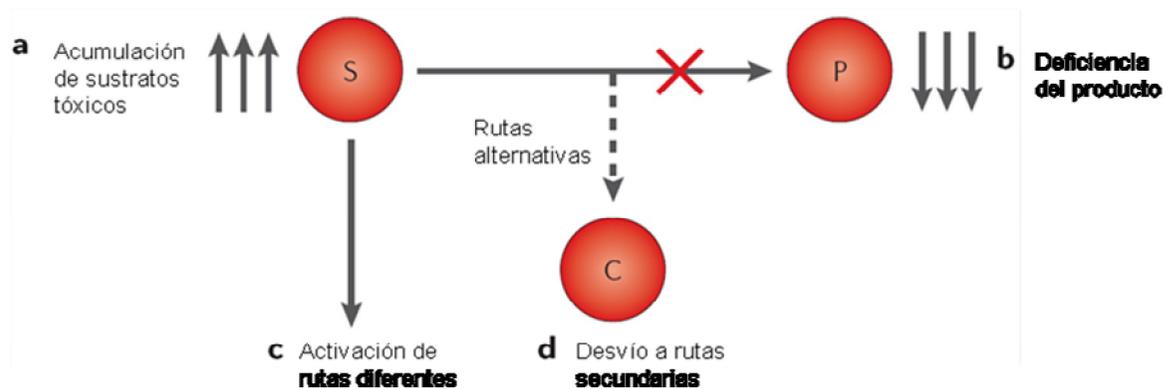
- Obtener el ADNc de IDSh sin la secuencia que codifica para el péptido señal nativo.
- Modificar los extremos del ADNc de la IDSh a través de la adición de extremos de reconocimiento para las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI*, con el fin de realizar una clonación direccional del ADNc de interés.
- Obtener clones de DH5 $\alpha$ /pPIC9-hIDS.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

Las alteraciones bioquímicas que causan la acumulación de sustratos o la deficiencia en la producción de algunos metabolitos fueron llamadas por Sir Archibald Garrod en 1908 Errores Innatos del Metabolismo (EIM), conocidos también como Trastornos o Enfermedades Metabólicas Hereditarias<sup>15</sup>.

Estas enfermedades se caracterizan por alteraciones bioquímicas de origen genético que modifican la estructura o función de moléculas protéicas que intervienen en el metabolismo. Es decir, el defecto estructural se expresa en la actividad de enzimas u otros compuestos necesarios en procesos de transporte, síntesis, o degradación de sustancias químicas bloqueando el flujo de metabolitos o de otros productos. A esto se suma, en algunos casos, la activación de vías alternas que intervienen en la producción de compuestos que regularmente no se encuentran en el organismo, dando lugar a desequilibrios químicos importantes<sup>3</sup> (Fig. 1).



**Figura 1.** Mecanismo patológico en los EIM. El efecto de un bloqueo enzimático resulta en: a) Toxicidad directa debido a la acumulación de sustrato (S) corriente arriba de la ruta; b) Deficiencia del producto (P) corriente abajo de la ruta metabólica; c) Activación de rutas alternas; d) Desvío del flujo metabólico a rutas secundarias y producción de metabolitos alternativos (C). Modificado de la referencia 3.

Las bases genéticas de los EIM son extremadamente heterogéneas y pueden involucrar cualquier tipo de defecto genético: uno o varios puntos de mutación, deleciones, inserciones o rearrreglos genómicos. Estas mutaciones pueden ocurrir en secuencias codificantes o reguladoras<sup>3</sup>; y es precisamente la heterogeneidad que presentan estas enfermedades la que dificulta un diagnóstico temprano, ya que precisan de determinaciones analíticas complejas y costosas<sup>16</sup>, sugiriendo así que la incidencia real de estos errores congénitos esté subestimada.

Aunque las enfermedades metabólicas hereditarias consideradas individualmente son raras, se han descrito una gran variedad de ellas (unas 700), cuyo número está constantemente en aumento. Esto hace que tomadas en conjunto, constituyan las enfermedades neonatales más frecuentes<sup>17,18,19</sup>, justificando la necesidad de profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en dichas enfermedades que permitan la implementación de tratamientos que mejoren la calidad de vida.

## **5.2 ENFERMEDADES DE DEPÓSITO LISOSOMAL**

Los desórdenes de depósito lisosomal representan un grupo de al menos 41 enfermedades genéticas distintas, cada una resultante de la deficiencia de una proteína lisosomal particular, o en algunos casos de proteínas no lisosomales que se encuentran involucradas en la biogénesis de los lisosomas<sup>20</sup>. La deficiencia en la actividad de alguna de estas enzimas resulta en la acumulación intralisosomal progresiva de metabolitos no degradados como esfingolípidos, glucógeno, mucopolisacáridos y glucoproteínas<sup>21</sup>.

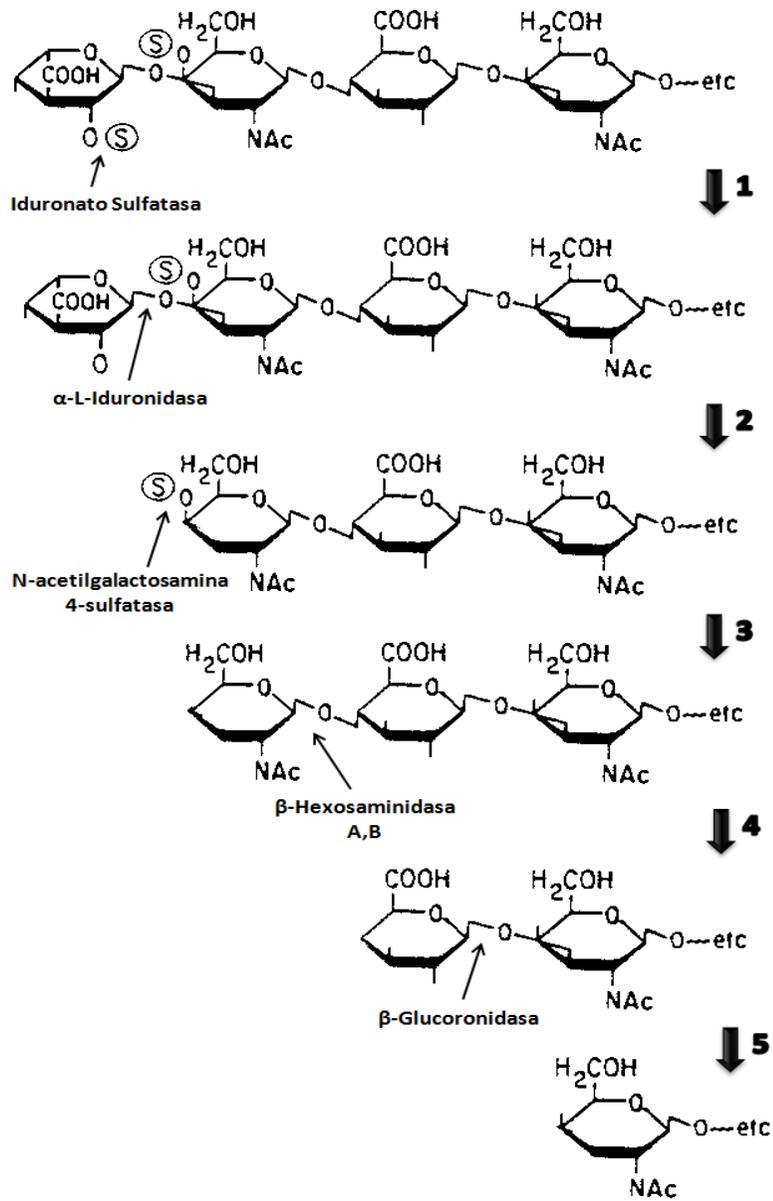
En estas enfermedades, la acumulación de los materiales no degradados conlleva a la interrupción de las funciones celulares y orgánicas, y ocasiona los signos y síntomas clínicos de las diferentes entidades patológicas<sup>22</sup>. Los cuadros clínicos vienen determinados por la distribución del metabolito acumulado en el tejido, en función de su localización fisiológica (sistema nervioso, órganos viscerales, tejido conjuntivo, entre otros) del sustrato implicado<sup>17,23</sup>.

Para describir las enfermedades lisosomales, se acostumbra convencionalmente agruparlas bajo los nombres químicos de los sustratos que se acumulan: lipidosis, mucopolisacaridosis y glucoproteinosis. La mayoría de estas patologías se transmiten de forma autosómica recesiva, excepto los Síndromes de Hunter y Fabry que se encuentran ligados al cromosoma X<sup>3</sup>.

### **5.3 MUCOPOLISACARIDOSIS**

Las mucopolisacaridosis (MPS) son un grupo de enfermedades causadas por la deficiencia de enzimas lisosomales que degradan glucosaminoglicanos (GAGs), llamados también mucopolisacáridos como el heparán sulfato (HS), dermatán sulfato (DS), queratán sulfato (KS) y condroitin 4 y 6 sulfato (CSA/CSC)<sup>17,24</sup>. Estos GAGs son sintetizados en el aparato de Golgi y secretados al espacio intracelular donde son ensamblados. Los GAGs son producidos por todas las células, y son especialmente abundantes en el tejido conectivo<sup>25</sup>.

En el tejido conectivo normal la reparación y remodelación de la matriz extracelular incluye la degradación de los GAGs, esto ocurre en los lisosomas, mediante enzimas que secuencialmente rompen la cadena de polisacáridos<sup>26</sup>. En la figura 2 se muestra la ruta de degradación del dermatán sulfato, donde la Iduronato 2-Sulfato Sulfatasa es la enzima que inicia la degradación de este GAG<sup>27</sup>.



**Figura 2.** Vía de Degradación del Dermatógeno Sulfato. Se muestran las enzimas involucradas en cada paso donde la IDS es la que inicia la vía de degradación. Modificado de la referencia 27.

La degradación de GAGs requiere de once enzimas<sup>28</sup>, los GAGs sin degradar o parcialmente degradados se acumulan en los lisosomas provocando la disfunción de las células, tejidos y órganos. En los pacientes afectados de MPS, los GAGs acumulados se excretan por la orina, lo cual se utiliza para la orientación diagnóstica de estas enfermedades<sup>2</sup>.

### **5.3.1 Mucopolisacaridosis tipo II o Síndrome de Hunter**

El síndrome de Hunter o Mucopolisacaridosis II (MPS II) fue descrito inicialmente por Charles Hunter en 1917<sup>29</sup>. Se trata de una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X causada por la deficiencia de la enzima lisosomal Iduronato 2-Sulfato Sulfatasa (EC. 3.1.6.13), llevando a la acumulación de heparán sulfato y dermatán sulfato en los lisosomas y la subsecuente excreción de estos en la orina<sup>30</sup>. Esta entidad clínica es de muy baja prevalencia a nivel mundial (1:34000- 1:132000)<sup>31,32,33,34</sup> y a nivel nacional se desconoce su incidencia y prevalencia.

#### **5.3.1.1 Manifestaciones Clínicas**

Clínicamente se ha observado un espectro de fenotipos, variando de severo a leve. La forma severa se caracteriza por presentar un deterioro crónico y progresivo que involucra múltiples órganos y tejidos. Estas manifestaciones se evidencian hacia los dos años de edad, con organomegalia progresiva, deterioro mental desde leve hasta el retardo profundo, macrocráneo, facies toscas, macroglosia, baja talla con tronco corto en relación a las extremidades, rigidez articular, hernias, lesiones en piel como hipertrichosis y lesiones papulares de distribución simétrica en las escápulas y las axilas<sup>35</sup>. A nivel esquelético presentan cifosis, sin joroba y disostosis múltiple leve. La expectativa de vida suele ser hasta la segunda década producto de la combinación del deterioro neurológico y la falla cardiorrespiratoria. En contraste, aunque en la forma leve de la enfermedad el déficit enzimático y los hallazgos de laboratorio son los mismos, las manifestaciones clínicas son similares pero menos severas. Estos pacientes presentan de forma característica obstrucción de la vía aérea por acumulación de mucopolisacáridos en la tráquea y en los bronquios y pueden sobrevivir hasta la cuarta o quinta década<sup>26,27</sup>.

El Síndrome de Hunter es una MPS sumamente rara y las estimaciones de su incidencia en distintos tipos de poblaciones han mostrado variaciones.. Aún así, en Colombia no existen datos de incidencia o prevalencia para el síndrome de Hunter.

## 5.4 IDURONATO 2 SULFATO SULFATASA HUMANA

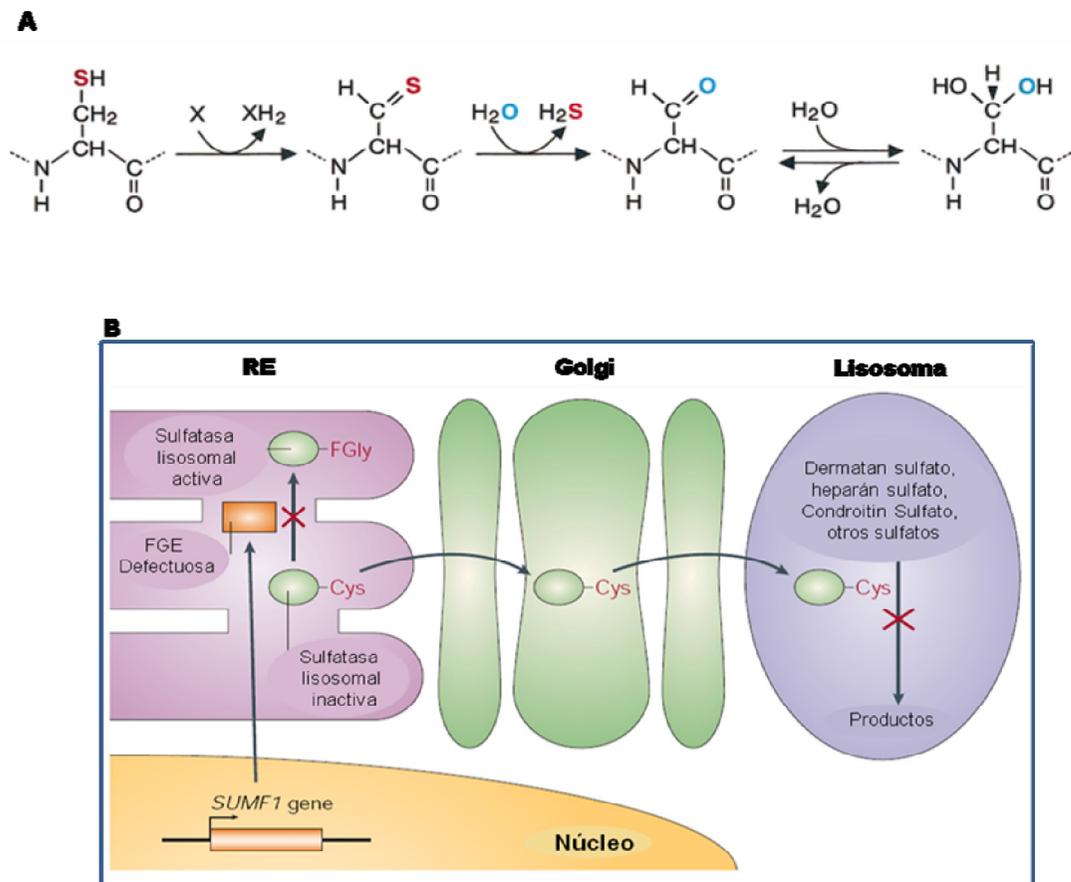
La IDS es una de las sulfatasas involucradas en la degradación de GAGs, específicamente de heparán sulfato y dermatán sulfato<sup>26</sup>. Estas sulfatasas son miembros de una familia de proteínas altamente conservadas que comparten similitudes funcionales y estructurales<sup>36</sup>. Contienen cerca del sitio activo un motivo hexapéptido común, L/V-C-X-P-S-R, donde X es un residuo que lleva un grupo hidroxilo o tiol<sup>37</sup>. En la figura 3 se muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos de la IDS con otras sulfatasas estudiadas donde se evidencia una marcada homología, indicando fuertemente que las sulfatasas eucariotas son miembros de una familia de genes conservados evolutivamente<sup>34,38,39</sup>.

		Length (residues)	Signal peptide	FGly	Accession No.
<b>A Human sulfatasas:</b>					
Arylsulfatase A	C T P S R A A L L T G R (Pos. 69-80)	507	+	+	X52151
Arylsulfatase B	C T P S R S Q L L T G R (Pos. 91-102)	533	+	+	J05225
Arylsulfatase C (Steroid sulfatase)	C T P S R A A F M T G R (Pos. 83-94)	583	+	n.d.	J04964
Arylsulfatase D	C T P S R A A F L T G R (Pos. 89-100)	593	+	n.d.	X83572
Arylsulfatase E	C T P S R A A F L T G R (Pos. 86-97)	589	+	n.d.	X83573
Arylsulfatase F	C S P S R S A F L T G R (Pos. 79-90)	591	+	n.d.	X97868
N-Acetylgalactosamine 6-sulfatase	C S P S R A A L L T G R (Pos. 79-90)	522	+	n.d.	U06088
N-Acetylglucosamine 6-sulfatase	C C P S R A S I L T G K (Pos. 91-102)	552	+	n.d.	Z12173
Iduronate sulfatase	C A P S R V S F L T G R (Pos. 84-95)	550	+	n.d.	M58342
Sulfamidase	C S P S R A S L L T G L (Pos. 70-81)	502	+	n.d.	U30894
<b>B Lower eukaryotic sulfatasas:</b>					
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	C T P S R S A I M T G R (Pos. 100-111)	551	+	n.d.	X16679
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	C T P S R S A I V T G R (Pos. 115-126)	567	+	n.d.	M28404
<i>Heliocidaris erythrogramma</i>	C T P S R S A I M T G R (Pos. 106-117)	559	+	n.d.	AF013158
<i>Volvox carteri</i>	C C P S R T N L W R G Q (Pos. 72-83)	649	+	+	X77214
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	C C P S R T N L C A A S (Pos. 73-84)	646	+	n.d.	X16180
<i>Neurospora crassa</i>	C C P A R V S L W T G K (Pos. 89-100)	639	+	n.d.	U89492
<b>C Prokaryotic sulfatasas:</b>					
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S A P A R S M L L T G N (Pos. 72-83)	577	+	+	M31938
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C S P T R S M L L T G T (Pos. 51-62)	533	-	+	Z48540
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	C A P A R A S F M A G Q (Pos. 54-65)	512	-	n.d.	U39940
<i>Burkholderia caryophylli</i> (phosphonate monoester hydrolase)	C G P A R A S L L T G L (Pos. 57-68)	514	-	n.d.	U44852

**Figura 3.** Homología parcial de la secuencia de aminoácidos de las sulfatasas de distintos grupos de organismos. Las secuencias sombreadas indican las regiones altamente conservadas. Tomado de la referencia 38.

Todas las sulfatasas sufren una modificación común, co o postraduccional en la cual un residuo específico de cisteína que se encuentra en el centro catalítico, es transformado hasta un residuo formil-glicina (FGly). Esta transformación se genera en el lumen del

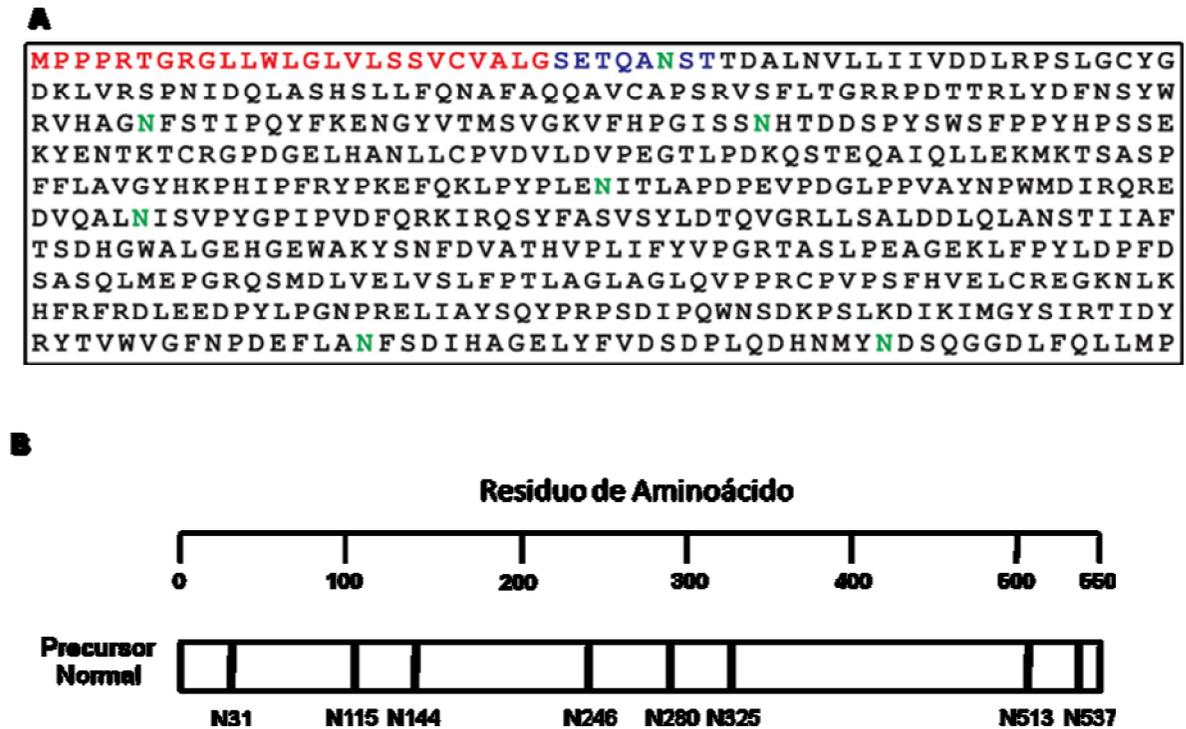
retículo endoplásmico por la acción de la enzima generadora de FGly (FGE) y convierte las sulfatasas en enzimas activas<sup>22</sup> (Fig. 4A-B). Esto se ha evidenciado en la deficiencia múltiple de sulfatasas (MSD), un desorden lisosomal de transmisión autosómica recesiva en el cual la actividad de todas las sulfatasas conocidas se encuentra disminuida. El análisis estructural de las sulfatasas sintetizadas en la MSD revela que estas enzimas no tienen la modificación FGly y por lo tanto son inactivas<sup>40,34</sup>.



**Figura 4.** Transformación del residuo Cisteína (Cys) a Formilglicina (FGly). **A.** Esquema hipotético de la conversión, donde la primera reacción es la oxidación del grupo tiol hasta un tialdehído usando una sustancia desconocida (X), como aceptor de hidrógenos. Las dos reacciones siguientes muestran la hidrólisis del tialdehído con liberación de H<sub>2</sub>S. La formación del aldehído hidratado puede ser espontánea. **B.** Mutaciones en el gen *Factor modificador de sulfatasas* (*SUMF1*) resultan en la producción de una *Enzima Generadora de Formilglicina* (FGE) deficiente, lo que conlleva a la producción de sulfatasas inactivas. Modificado de las referencias 22 y 37.

La enzima Iduronato 2 Sulfato Sulfatasa (IDS) elimina el sulfato en el carbono 2 del ácido L-idurónico presente en el dermatán sulfato y el heparán sulfato (Fig. 2). La proteína es

una enzima glicosilada con 550 residuos de aminoácidos de los cuales los primeros 25 corresponden a la secuencia del péptido señal, los siguientes 8 son eliminados en el procesamiento de la proteína madura y los restantes aminoácidos son el péptido maduro que contiene 8 sitios potenciales de N-glicosilación<sup>41,42</sup> (Fig. 5A-B).



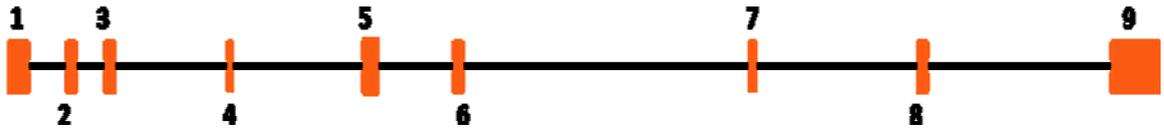
**Figura 5.** Secuencia aminoacídica de la IDS y sitios potenciales de N-Glicosilación. **A.** Los primeros 25 residuos (rojo) corresponden al péptido señal y otros 8 aminoácidos (azul) son hidrolizados durante el procesamiento postraduccional de la enzima; en verde se muestran los sitios potenciales de glicosilación. **B.** Esquema simplificado donde se observan las posiciones de los 8 sitios de N-glicosilación. Modificado de las referencias 42 y 41.

Se comprobó mediante mutagénesis dirigida en células COS, que el centro activo de la proteína está relacionado con la cisteína en posición 84<sup>39</sup>, donde al igual que en otras sulfatas para su actividad catalítica requiere la conversión postraduccional a un residuo FGly.

Los estudios de maduración de la enzima expresada en fibroblastos<sup>43</sup> y células COS<sup>39,43</sup> indican que la IDS es procesada como un polipéptido de 72 a 76kDa, que luego es glicosilado y fosforilado hasta 90kDa. Por rompimientos proteolíticos posteriores y



codificantes, y el transcrito de 1,4kb codifica para una enzima parecida a la IDS<sup>45,47</sup>. Recientemente se ha reportado un pseudogen (IDS2) distal al gen de la IDS, aunque tiene secuencias homologas a los exones 2 y 3 y a los intrones 2, 3 y 7 del gen de la IDS se desconoce su función<sup>44</sup>.

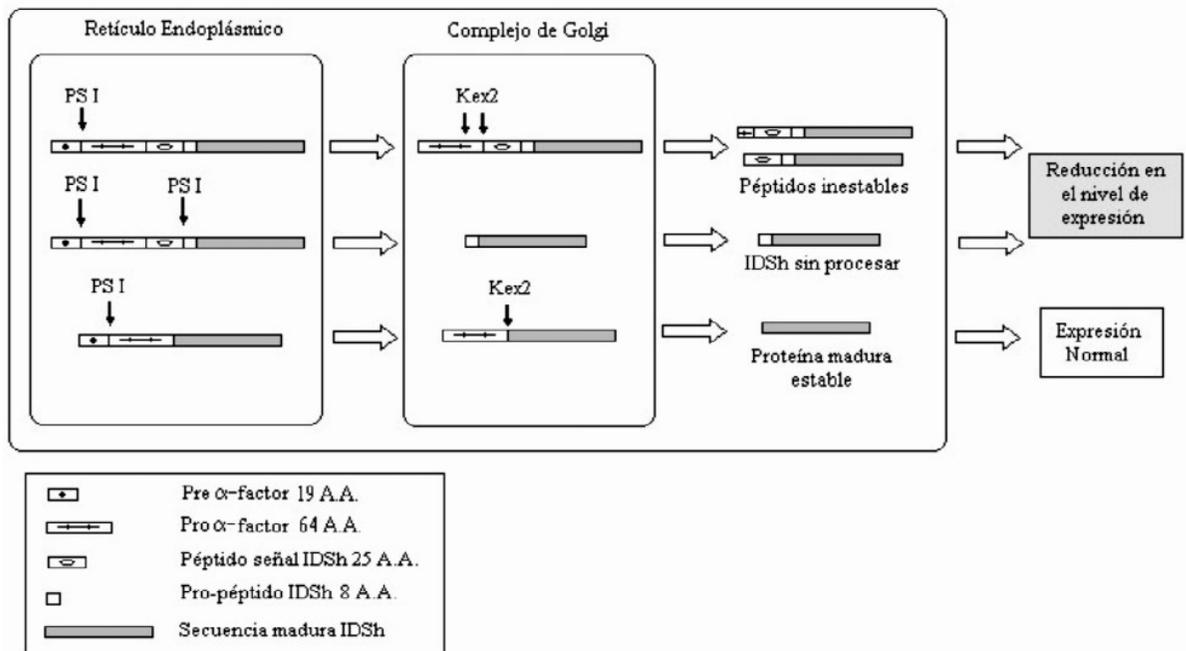


**Figura 8.** Representación esquemática del gen de la Iduronato 2 Sulfato Sulfatasa. Las regiones exónicas se observan en rojo y las intrónicas en negro. Tomado de IDS gene- NCBI.

#### 5.4.2 Estructura Terciaria de la IDShr con la secuencia del péptido señal

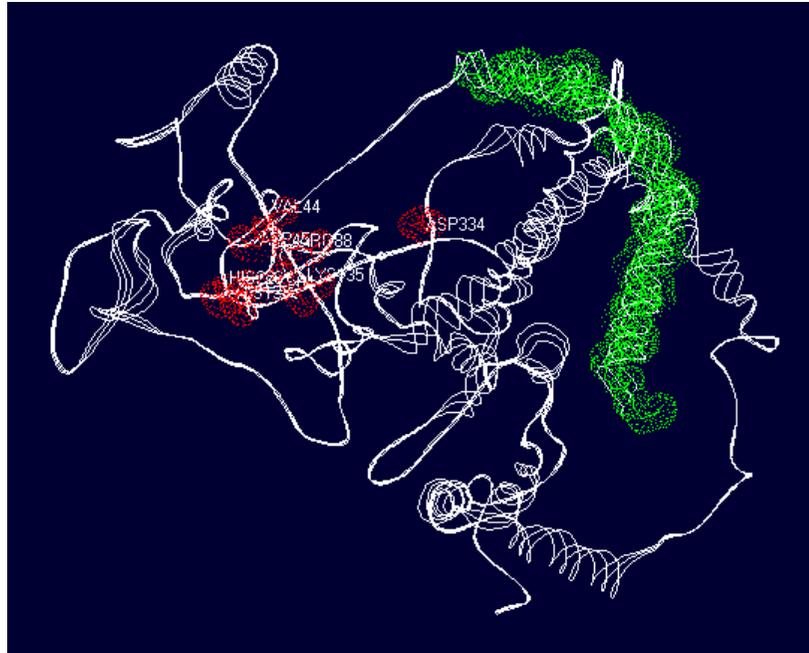
Con el propósito de comparar la secuencia nativa de la IDSh y la expresada en un trabajo anterior<sup>7</sup>, se alinearon las secuencias del ADNc de la IDSh nativa y la que codifica para la enzima recombinante. Esto permitió establecer que el plásmido de expresión pPIC9-IDS obtenido en dicho trabajo, contenía tanto la secuencia señal nativa de la IDSh, como la secuencia completa de la señal de secreción de *S. cerevisiae*  $\alpha$ -MF<sup>13</sup>.

Las hipótesis con respecto a la presencia de ambas secuencias señal, y su consecuencia en la secreción de la proteína (Fig. 9) plantean que pueden generarse péptidos inestables por la presencia de aminoácidos adicionales, una proteína sin procesar y por lo tanto inactiva o una proteína estable en el caso de darse un procesamiento adecuado de las secuencias señal<sup>8</sup>.



**Figura 9.** Posibles alteraciones de la secreción causadas por la presencia del péptido señal nativo en la IDS<sub>h</sub>. **a.** Se generan péptidos inestables por la presencia de aminoácidos adicionales o por el corte aberrado de la secuencia por la enzima Kex2. **b.** La peptidasa señal I (PS I) realiza el corte del péptido señal en la membrana del RE y la proteína es liberada del α-Factor y queda con la pro-proteína. **c.** Péptido recomendado en el que se elimina completamente el péptido señal de la IDS<sub>h</sub>. Tomado de la referencia 8.

Siguiendo este orden de ideas, al modelar la estructura terciaria se le adicionaron los 33 aminoácidos que se eliminan en el proceso de maduración de la enzima<sup>13</sup>. La figura 10 presenta el modelo computacional de la IDS<sub>h</sub> que incluye los mencionados residuos. En la misma se observa que los 33 aminoácidos adicionales, forman una hélice, una parte de la cual cubre completamente la entrada al bolsillo donde se encuentran los aminoácidos que componen el sitio activo y la región restante se pliega buscando ubicarse en un espacio que presenta la estructura de la proteína.



**Figura 10.** Modelos de la estructura terciaria de IDSr conteniendo el péptido señal nativo. En verde se muestran los 25 residuos del péptido señal y los ocho siguientes del propéptido y en rojo los aminoácidos que conforman el sitio activo. Tomado de la referencia 13.

En el trabajo realizado por Sáenz en el 2005, se plantea que la presencia de la secuencia señal nativa puede afectar los niveles de expresión de la IDSr, dando explicación a las bajas concentraciones de IDSr activa en la mayoría de las fermentaciones realizadas. Esto, argumentando que la conformación de la IDSr expresada en los modelos biológicos está afectada por las alteraciones que sufre la proteína al mantener una región adicional altamente hidrofóbica que, sin duda, genera cambios en la conformación tridimensional, que se traducen en una proteína plegada incorrectamente, posiblemente retenida y luego degradada intracelularmente.

Asumiendo que el modelo está diseñado para secretar la proteína heteróloga, se trabajó fundamentalmente con los sobrenadantes. Aún así, para explorar la posibilidad surgida de retención de proteína mal plegada al interior del retículo endoplásmico, complejo de Golgi o aun que haya podido ser enviada a los lisosomas, se realizó la ruptura de células. Los lisados mostraron niveles de actividad enzimática que variaron entre 0,58 y 4,24 nmol/h/mg de proteína. Los sobrenadantes de dicho cultivo presentaron actividad de 3,25 nmol/h/mg de proteína. Los datos obtenidos y la presencia de IDSr intracelularmente,

sugirieron que la actividad total del sistema de expresión podría llegar a ser hasta el doble de la encontrada en los sobrenadantes, justificando la necesidad de realizar un nuevo constructo pPIC9-IDS sin la secuencia que codifica para el péptido señal nativo<sup>13</sup>.

## **5.5 TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DE HUNTER**

Históricamente, el tratamiento para el síndrome de Hunter ha sido un tratamiento de sostén enfocado al manejo de los problemas clínicos. El trasplante de médula ósea ha sido la aproximación terapéutica más usada<sup>48,49</sup>, aún así los resultados no han sido satisfactorios, pues no se ha logrado la regresión de los síntomas ni detener su progresión a largo plazo. Este procedimiento tampoco ha presentado efecto alguno sobre el retardo mental. El tratamiento con intercambio de plasma no demostró beneficio clínico alguno, a pesar de observarse un aumento en la actividad de la enzima plasmática de los pacientes tratados<sup>50</sup>. Por otro lado el trasplante de fibroblastos histocompatibles de individuos sanos a pacientes Hunter, produjo un aumento en la actividad de la enzima acompañada por el correspondiente incremento en la degradación del heparán y dermatán sulfato. Tanto la actividad como el incremento de la degradación de los mucopolisacáridos se mantuvo durante el tiempo de estudio (2,5 a 3,7 años), si bien el retardo mental de los pacientes no mejoró, tampoco hubo progresión del mismo<sup>51</sup>.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios de intercambio por plasma y trasplante de fibroblastos, se pudo inferir que la enfermedad podría responder al tratamiento con enzima exógena siempre y cuando tuviera las características adecuadas para ser endocitada por los tejidos blanco del tratamiento. Estos resultados, el ADNc de la IDS clonado, y la posibilidad de implementar un sistema para producir la enzima en un buen sistema de expresión, hicieron del síndrome de Hunter un candidato para el tratamiento con Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE), que consiste en administrarle al paciente la proteína o enzima en forma activa de la misma manera que se trata la diabetes con insulina o la hemofilia con el factor VIII de la coagulación<sup>52</sup>.

Recientemente, fue aprobado por la FDA y la Comisión Europea (CE) un medicamento denominado *Elaprase*<sup>™</sup> (idursulfasa- comercializada por *Shire Human Genetic Therapies, Inc., Cambridge, MA*) para el tratamiento del síndrome de Hunter. Se trata de una forma recombinante de la IDS, producida en una línea continua de células humanas transfectadas con un plásmido de expresión que codifica para 550 aminoácidos de la IDS<sub>h</sub>, incluyendo una secuencia señal de 25 aminoácidos que es cortada en el proceso de maduración de la proteína.

Al realizar la caracterización de la proteína, se estimó una pureza del 99.9% por medio de ensayos electroforéticos y cromatográficos. Adicionalmente, se comprobó que los 8 sitios de N-glicosilación se encontraban completos y consistían en residuos de Manosa 6-Fosfato (M6P), permitiendo una alta afinidad con los receptores de la superficie celular y su posterior envío hacia los lisosomas vía receptores M6P. Por otra parte, se estimó que la conversión postraduccional del residuo de Cisteína a FGly requerido para la actividad de la enzima, se lleva a cabo con una eficiencia del 50% que, aunque se trata sólo de la mitad, es suficiente para que la actividad enzimática sea positiva<sup>53, 54, 55</sup>.

Los efectos de *Elaprase*<sup>™</sup> se probaron en modelos de laboratorio antes de estudiarse en humanos. En el estudio principal de *Elaprase*<sup>™</sup> participaron 96 pacientes varones entre 5 y 31 años y se comparó la eficacia con un placebo. Dentro de los beneficios encontrados en el tratamiento, se destacan la reducción de un 49% en la cantidad de GAGs excretados en orina luego de 48 semanas de tratamiento, reducción en el volumen del hígado y el bazo luego de 24 semanas, y un aumento en la resistencia y la distancia recorrida en la prueba de caminata de 6 minutos<sup>54</sup>. Comprobando así que los beneficios de *Elaprase*<sup>™</sup> fueron mayores que sus riesgos en el tratamiento a largo plazo de pacientes con síndrome de Hunter, llevando a la autorización de su comercialización.

## **5.6 TERAPIA DE REEMPLAZO ENZIMÁTICO PARA ENFERMEDADES LISOSOMALES**

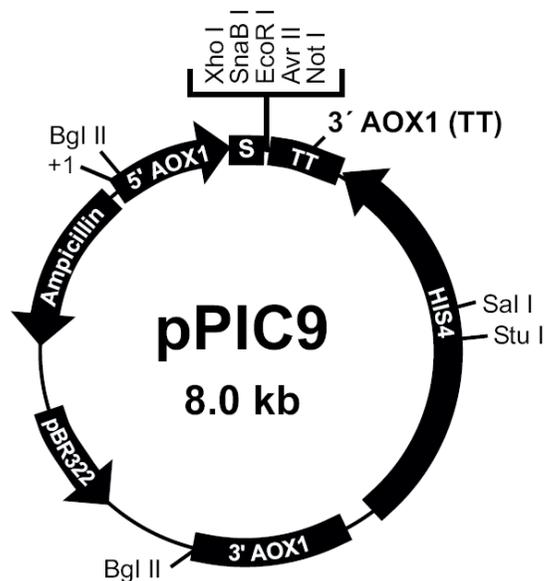
Las MPS son enfermedades incapacitantes y la mayoría de ellas incurables, porque el defecto se halla a nivel de los genes. Esto las convierte en entidades sin tratamiento farmacológico convencional y como se mencionó anteriormente, su manejo se ha dirigido a controlar las manifestaciones clínicas con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes. Con este propósito se han utilizado el control nutricional, el trasplante de córnea, el uso de audífonos, cirugía ortopédica, entre otros<sup>2</sup>. En efecto, el tratamiento ideal para este tipo de patologías, debe ser aquel que pueda implementarse en etapas tempranas de la vida para prevenir las secuelas a largo plazo y corregir desde sus inicios el defecto.

En este sentido, los grandes hallazgos biotecnológicos a partir de los años 80, tales como la clonación del ADN, la síntesis de oligonucleótidos, aislamiento y empleo de enzimas que cortan o pegan fragmentos de ADN y la ingeniería genética de plásmidos bacterianos, revolucionaron la investigación en biomedicina y proporcionaron la base experimental para intentar estudios conducentes a buscar el desarrollo de terapéuticas tales como la terapia génica o la terapia de reemplazo enzimático.

Hoy en día, los protocolos de terapia génica y TRE, son una realidad<sup>56</sup>. Sin embargo, aunque la terapia génica tiene un gran potencial para tratar una amplia gama de enfermedades humanas y los procedimientos podrían realizarse con bajo riesgo de reacciones adversas, los resultados en pacientes humanos han demostrado que aun no se han logrado los niveles óptimos de transferencia y expresión de los genes exógenos<sup>57</sup>. Esto ha obligado a que su empleo se haya restringido, mientras son desarrollados sistemas más eficientes de transferencia de los genes terapéuticos y se profundiza en el conocimiento sobre los mecanismos de expresión y regulación genética de estos en las células transfectadas. De lo anterior puede concluirse que la TRE en las actuales circunstancias, se presenta como la alternativa más viable y rápida para el tratamiento de las enfermedades genéticas<sup>11,21</sup>.

## 5.7 pPIC9 COMO VECTOR DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

El plásmido pPIC9 (Invitrogen San Diego Ca. U.S.A.) (Fig. 11), es un vector de integración para la expresión de proteínas en la levadura *Pichia pastoris*. Contiene la secuencia del promotor del gen de la enzima alcohol oxidasa 1 (AOX1), una secuencia señal (S) ( $\alpha$ -factor o  $\alpha$ -MF derivado de *Saccharomyces cerevisiae*) para secretar las proteínas al medio extracelular, un sitio múltiple de clonación, un sitio de transcripción-terminación (TT), el gen de resistencia a la ampicilina, el sitio de origen de replicación en *Escherichia coli* para su multiplicación en esta bacteria y el gen HIS4 que codifica para la histidinol deshidrogenasa. Éste vector contiene además dos sitios de restricción para las enzimas *Sal* I y *Stu* I creados por ingeniería genética, las cuales se utilizan para hacer lineal el plásmido favoreciendo su integración al locus *his4* del genoma de *P. pastoris*. Esta integración ocurre por un evento de entrecruzamiento simple entre el loci *his4* en el cromosoma de la levadura y el gen HIS4 en el vector<sup>58</sup>.



**Figura 11.** Esquema del plásmido de expresión pPIC9. El esquema muestra, la secuencia señal de secreción  $\alpha$ -Factor, un sitio múltiple de clonación, el gen de resistencia a la ampicilina, la región de replicación en *E. coli*, dos sitios para las enzimas de restricción *sal* I y *Stu* I, que permiten linealizar el vector para facilitar su integración al genoma de *Pichia pastoris*. Tomado de la referencia 58.

### 5.7.1 Señal de Secreción Péptido $\alpha$ -Factor ( $\alpha$ -MF)

Por lo general, en cuanto a la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* se ha optado por su secreción hacia el medio extracelular, debido a que la recuperación de la molécula desde el medio de cultivo representa un primer paso en el proceso de purificación<sup>59</sup>.

Con el fin de obtener una secreción eficiente, el ADNc se fusiona con una secuencia líder compatible por el modelo de expresión, lo que además favorece la estabilidad del sistema<sup>60</sup>. En *P. pastoris*, la señal de secreción empleada con mayor frecuencia es el péptido  $\alpha$ -Factor de *S. cerevisiae*, que facilita el transporte de la proteína a través del retículo endoplásmico (RE) y el complejo de Golgi, antes de su ubicación en las vesículas de secreción<sup>61</sup>. En el año de 1982 se obtuvo la secuencia completa del  $\alpha$ -MF<sup>62</sup>, consta de 85 aminoácidos, donde los primeros 19 residuos corresponden al péptido señal y los siguientes 66 a la región denominada pro-secuencia, que contiene tres sitios potenciales de N-glicosilación en los residuos 4, 38 y 48<sup>63</sup>.

En *P. pastoris* varias proteínas recombinantes han sido secretadas eficientemente utilizando el péptido señal nativo heterólogo (es decir, el péptido señal propio de la proteína a expresar), mientras que otras han mostrado rendimientos dos o tres veces superiores cuando utilizan un péptido señal de levadura ( $\alpha$ -MF, *PHO1* ó *SUC2*)<sup>64</sup>. Esta información lleva a pensar en la necesidad de realizar comparaciones entre la producción de proteínas recombinantes de interés utilizando el péptido señal nativo heterólogo y su producción utilizando el péptido señal de levaduras.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 MICROORGANISMOS

#### 6.1.1 *Escherichia coli*

Para la multiplicación de los plásmidos pUC13-IDS, pPIC9 y pPIC9-hIDS, se empleó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*), del banco de cepas del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).

### 6.2 CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS

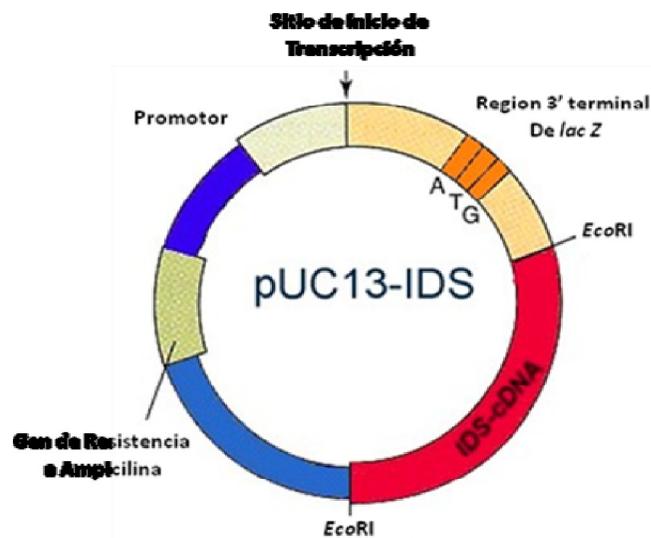
Las bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  se cultivaron a 37°C y 180-220 rpm durante 12-18 h, utilizando medio de cultivo LB (Luria-Bertani Broth). Los cultivos en medio líquido se realizaron en tubos de ensayo de 20mL conteniendo 1800 $\mu$ L del medio inoculado con 200 $\mu$ L bacterias. En el caso de cultivos con cepas transformadas con pUC13-IDS, pPIC9 y pPIC9-hIDS se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina a una concentración de 100 $\mu$ g/mL. Para la conservación de las cepas se sirvieron alícuotas de 500 $\mu$ L de bacterias en 500 $\mu$ L de glicerol al 60% y se almacenaron a -20°C.

### 6.3 PLÁSMIDOS

#### 6.3.1 pUC13-IDS

El plásmido pUC13-IDS (Fig. 12), fue gentilmente donado por el Dr, Shunji Tomatsu (Gifu University, Gifu, Japón) para un trabajo realizado anteriormente en el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo<sup>7</sup>. Es un vector que contiene la secuencia regulatoria y la 3' del

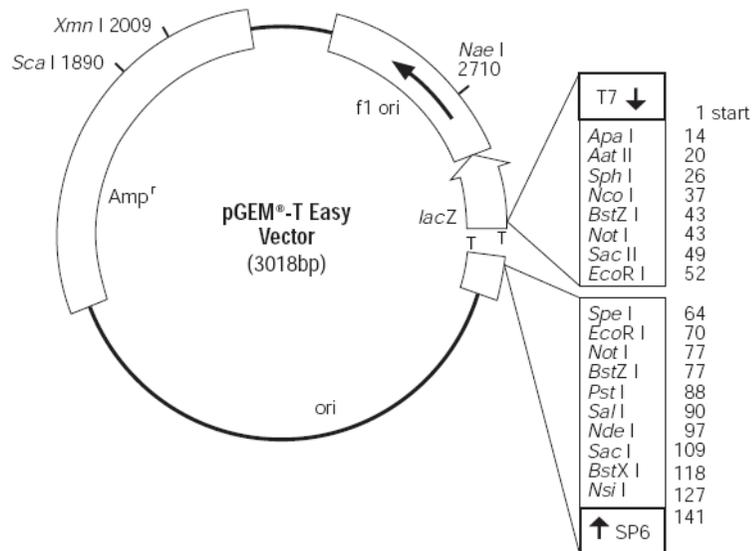
gen de la  $\beta$ -galactosidasa (gen *lacZ*) del operón *lac*. Contiene un sitio múltiple de clonación (SMC), un origen de replicación, un sitio de transcripción-terminación (TT) y el gen de resistencia a la ampicilina. El pUC13-IDS fue construido insertando el cDNA de la IDS (1.7kb), el sitio de restricción para la enzima *EcoRI*, el tamaño total de este constructo fue de 4.4kb.



**Figura 12.** Esquema del vector recombinante *pUC13-IDS*. El cDNA de la IDS, fue clonado en el sitio de restricción *EcoRI*, del vector *pUC13*. Se indican las regiones 3' del gen *lacZ*, sitio de inicio de la transcripción, el promotor del operón *lacZ* y el gen de resistencia a la ampicilina. Modificado de la referencia 9.

### 6.3.2 pGEM-T Easy

El vector *pGEM®-T Easy* de Promega es un sistema de clonación realizado por medio del corte del vector con la enzima de restricción *EcoRV* (que realiza un corte romo en el palíndromo GATATC), para luego agregar un desoxitimidilato en los extremos 3' de la secuencia. El vector posee las características básicas de un plásmido de clonación<sup>65</sup> (figura 13).



**Figura 13.** Vector de clonación pGEM®-T Easy. El vector contiene los promotores T7 y SP6 flanqueando el sitio múltiple de clonación para facilitar la secuenciación del inserto. La inserción del ADN de interés inactiva el segmento *lacZ* permitiendo una identificación directa de los clones transformantes (Blancos) cuando se encuentran en un medio suplementado con Ampicilina/IPTG/X-Gal.

### 6.3.2 pPIC9

Las características principales de éste vector fueron descritas previamente en apartado 5.7 (Fig. 11).

## 6.4 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Para la extracción de plásmidos se utilizó el estuche de purificación *Wizard®Plus SV Minipreps* de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1) y la presencia de ADN plasmídico se comprobó realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con Bromuro de Etidio 1µg/ml, utilizando tampón de corrido 1X TBE (Trisma base 1M, ácido bórico 1M y EDTA 20mM) con la aplicación de una diferencia de potencial de 80V; el gel se visualizó en luz UV a una longitud de onda de 312 nm. Como marcadores de talla molecular se utilizaron  $\lambda$  *HindIII* y 1Kb Plus de Invitrogen®.

Nota: Las condiciones de electroforesis descritas anteriormente, se utilizaron a lo largo de todo el trabajo.

## **6.5 OBTENCIÓN DEL ADNc DE LA IDS SIN PÉPTIDO SEÑAL NATIVO (hIDS)**

### **6.5.1 Restricción de pUC13-IDS**

Para obtener el ADNc de la IDS sin péptido señal nativo fue necesario partir del constructo pUC13-IDS para liberar el fragmento de la IDS por medio de una restricción con la enzima *EcoRI* (Invitrogen). La digestión enzimática se llevó a cabo mezclando 2µL de tampón 10X (Concentración final 1X: 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM NaCl), 15µL del producto de extracción del pUC13-IDS, 0,5 unidades de enzima y agregando agua estéril hasta completar un volumen final de 20µL. La mezcla se incubó a 37°C por 2 horas, seguida de una inactivación de la enzima a 65°C durante 15 minutos.

Para la predicción de las bandas esperadas luego de la restricción, se realizó una restricción virtual del constructo utilizando el programa disponible en la red *NEBcutter 2.0*<sup>66</sup>.

La banda obtenida de 1.4Kb, correspondiente al ADNc de la IDS fue extraída del gel y purificada con el estuche de purificación de bandas *GenElute™ Minus EtBr Spin Column* de Sigma siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 2).

### **6.5.2 Amplificación por PCR del ADNc de IDS sin péptido señal nativo**

El fragmento correspondiente al ADNc de la IDS que previamente fue purificado presenta una secuencia que traduce para el péptido señal nativo. Por esta razón, se utilizaron cebadores específicos para eliminar esta secuencia mediante amplificación por PCR.

El diseño de los cebadores se realizó teniendo en cuenta que el fragmento obtenido por PCR sería luego ligado al sitio múltiple de clonación del vector pPIC9 entre los sitios de

restricción para las enzimas *XhoI* y *NotI*, favoreciendo una clonación direccional del inserto. Las secuencias y algunas características de los cebadores se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Cebadores utilizados para amplificar el ADNc de la IDS sin la secuencia que codifica para el péptido señal nativo. Las porciones que se alinean con la secuencia de IDS se encuentran subrayadas. **IDS-F** (46 nucleótidos), contiene un sitio de restricción para *XhoI* (en rojo) y la secuencia necesaria para restaurar la señal de corte proteolítico del  $\alpha$ -MF presente en el vector pPIC9. **IDS-R** (35 nucleótidos), contiene un sitio de restricción para *NotI* (en rojo) y la secuencia correspondiente al codón de parada.

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia 5´- 3´</b>	<b>Número de nucleótidos</b>
IDS-F	<u>gctcgag</u> aaaagagaggctgaagcttccgaaacgcaggccaactcg	46
IDS-R	g <u>cgggccg</u> cttaagaattccactgagggatgtctg	35

Para la reacción de PCR se utilizaron 5µL de ADN (utilizando como molde el ADNc de la IDS purificado obtenido por la restricción de pUC13-IDS con *EcoRI*), 3µL de tampón (10X) (Concentración final 1X: 20mM Tris-HCl, 50mM KCl pH 8.4), 2µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 3µL de dNTPs (2mM), 0,12µL de cada cebador (50µM cada uno), 0,5µL de Taq-ADN polimerasa de Invitrogen®, completando con agua estéril hasta 30µL de volumen final.

El programa de amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: un primer ciclo de desnaturalización a 94°C (5 minutos); 30 ciclos de desnaturalización a 94°C (45 segundos), alineamiento a 65°C (45 segundos), extensión a 72°C (45 segundos); y un ciclo final de extensión a 72°C (5 minutos). El producto de la reacción se corrió en un gel de agarosa y los resultados obtenidos fueron comparados con los patrones producidos por los marcadores de talla molecular  $\lambda$  *HindIII* y 1Kb de Invitrogen como se describió en el numeral 4.4.

## 6.6 SUBCLONACIÓN DEL ADNc DE hIDS

La ligación del fragmento de la hIDS al vector pGEM®-T *Easy* se realizó utilizando 0,05µg del vector y 0,1µg del inserto (previamente purificado como se describe en el anexo 2 para eliminar el exceso de otros compuestos producto de la PCR que pudieran influir en la reacción de ligación), con 3 unidades de T4 ADN ligasa en 5µL del tampón de ligación

rápida (*2X Rapid Ligation Buffer*) del estuche *LigaFast®* de Promega (Concentración final 1X: 30mM Tris-HCl pH 7.8, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 1mM ATP, 5% PEG), para un volumen final de 10μL. La reacción se incubó 3 horas a temperatura ambiente y luego fue almacenada a -20°C.

## **6.7 TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli***

### **6.7.1 *E. coli* competentes**

Las células de *E. coli* se hicieron competentes utilizando Cloruro de Calcio 0,5M (CaCl<sub>2</sub>) siguiendo la metodología descrita por Sambrook<sup>67</sup> con algunas modificaciones realizadas para este trabajo, el procedimiento se describe a continuación.

Se crecieron 200μL de bacterias sin transformar en 1800μL de medio LB durante toda la noche a 37°C y agitación constante (180-220 rpm). Como control, a otro tubo de ensayo se le adicionó la misma cantidad de bacterias a un medio de cultivo suplementado con Ampicilina a 100μg/ml para verificar que no presentaran resistencia previa al antibiótico.

Al día siguiente, se tomaron 200μL de las células bacterianas que crecieron durante toda la noche y se adicionaron en un tubo de ensayo de 20mL con 1800μL de caldo LB precalentado a 37°C, para luego ser incubadas nuevamente durante 3 horas para obtenerlas en la fase exponencial de crecimiento. A continuación, la muestra se trasladó a un tubo eppendorf de 2ml y se introdujo en hielo durante 20 minutos, pasado este tiempo, la muestra se centrifugó a 4000 rpm a 4°C durante 15 min, el sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido en 400μL de CaCl<sub>2</sub> a 4°C y a una concentración de 0.5M. Se centrifugó a 4000 rpm a 4°C durante 15 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió nuevamente en 400μL de CaCl<sub>2</sub> 0,5 M a 4°C. Finalmente, las bacterias fueron puestas en hielo hasta ser utilizadas en la transformación.

### **6.7.2 Transformación de *E. coli* competentes**

Se tomaron tres tubos de 2ml con 5µL de muestra distribuidos así:

Tubo 1: Producto de la ligación pGEM®-T *Easy*-hIDS.

Tubo 2: Vector pUC13-IDS (como control positivo de la transformación).

Tubo 3: Agua estéril (como control negativo de la transformación).

A cada tubo se le transfirieron 50 µL de las células competentes frescas, se mezclaron suavemente con golpe de dedos y se colocaron en baño frío durante 20 min., luego de los cuales se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 2 min. Los tubos se retornaron inmediatamente al baño frío por 2 min y a cada mezcla se le agregaron 950µL de medio LB a temperatura ambiente, incubando luego con agitación suave por 3 horas a 37°C. Finalmente, las colonias transformadas fueron sembradas en cajas de Petri con medio LB agar, con ampicilina a 100µg/ml como antibiótico de selección. Cuando las placas estuvieron secas se incubaron entre 14 y 16 horas a 37°C. Las bacterias transformadas fueron seleccionadas, crecidas en LB Ampicilina 100µg/ml y almacenadas en glicerol al 30%. Los vectores recombinantes producto de la clonación de la hIDS en el vector pGEM®-T *Easy* fueron llamados pGEM-T/hIDS.

## **6.8 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO DE ESPRESIÓN pPIC9/hIDS**

### **6.8.1 Preparación del vector (pPIC9) y el inserto (ADNc de hIDS)**

Con el fin de generar compatibilidad entre los extremos del vector y el inserto, el vector pPIC9 y el constructo pGEM-T/hIDS se cortaron en reacciones por separado utilizando las enzimas de restricción *XhoI* (Promega) y *NotI* (Invitrogen); realizando una primera digestión con *XhoI* seguida de una segunda digestión con *NotI* tomando como muestra de ADN la primera digestión para obtener los extremos adecuados para la ligación direccional.

La primera reacción se llevó a cabo mezclando 15,2µL de muestra con 1,8µL tampón 10X (Concentración final: 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM de NaCl) y 0,5 unidades de *Xho*I para completar un volumen final de 18µL. Esta mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C, seguida de una inactivación de la enzima a 65°C por 15 minutos. Para la segunda reacción se utilizó como muestra el producto de la primera reacción, al cual se le agregaron 0,23µL de agua, 2,1µL de tampón y 0,5 unidades de *Not*I, esta mezcla se incubó de igual forma que la primera reacción. A continuación, ambos productos se purificaron con el estuche de purificación de bandas *GenElute™ Minus EtBr Spin Column* de Sigma siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 2).

### **6.8.2 Ligación de hIDS con pPIC9**

La ligación del fragmento de la hIDS al plásmido pPIC9 se realizó utilizando 0,6µg del inserto y 0,3µg del vector, con 3 unidades de T4 ADN ligasa en 5µL del tampón de ligación rápida (*2X Rapid Ligation Buffer*) del estuche *LigaFast®* de Promega, para un volumen final de 10µL. La reacción se incubó a 4°C durante toda la noche. Adicionalmente, se llevó a cabo un control de la ligación utilizando el vector pPIC9 digerido con las enzimas *Xho*I y *Not*I, donde se utilizaron las mismas cantidades de T4 y tampón de ligación que se describieron anteriormente, excepto que el volumen de ADN a ligar fue de 4µL. Las bacterias competentes se transformaron y seleccionaron como se describió en el numeral 6.7.2 y los vectores recombinantes producto de la clonación de la hIDS en el vector pPIC9 fueron llamados pPIC9-hIDS.

## **6.9 EVALUACIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE**

Para comprobar la ligación del fragmento de la hIDS en el vector pPIC9, luego de realizar una extracción de plásmidos se llevó a cabo una reacción de restricción utilizando las enzimas *Xho*I y *Not*I, esto con el fin de liberar el fragmento de la hIDS. El producto de la reacción se visualizó realizando una electroforesis en gel de agarosa como se mencionó en secciones anteriores y se comparó con los patrones producidos por los marcadores de talla molecular  $\lambda$  *Hind*III y 1Kb de Invitrogen.

## 6.10 SECUENCIACIÓN DE hIDS

Para comprobar los resultados obtenidos, el inserto obtenido en la subclonación (pGEM-T *Easy*-hIDS) fue secuenciado en el CIAT siguiendo el método descrito por Sanger<sup>68</sup>. La reacción se llevó a cabo en un secuenciador automático *ABI PRISM 377* utilizando la mezcla de reacción *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing*. Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación fueron los correspondientes a los promotores T7 y SP6, que flanquean el sitio múltiple de clonación del pGEM-T *Easy* (Fig. 13).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 OBTENCIÓN DEL ADNc DE LA hIDS

#### 7.1.1 Restricción de pUC13-IDS

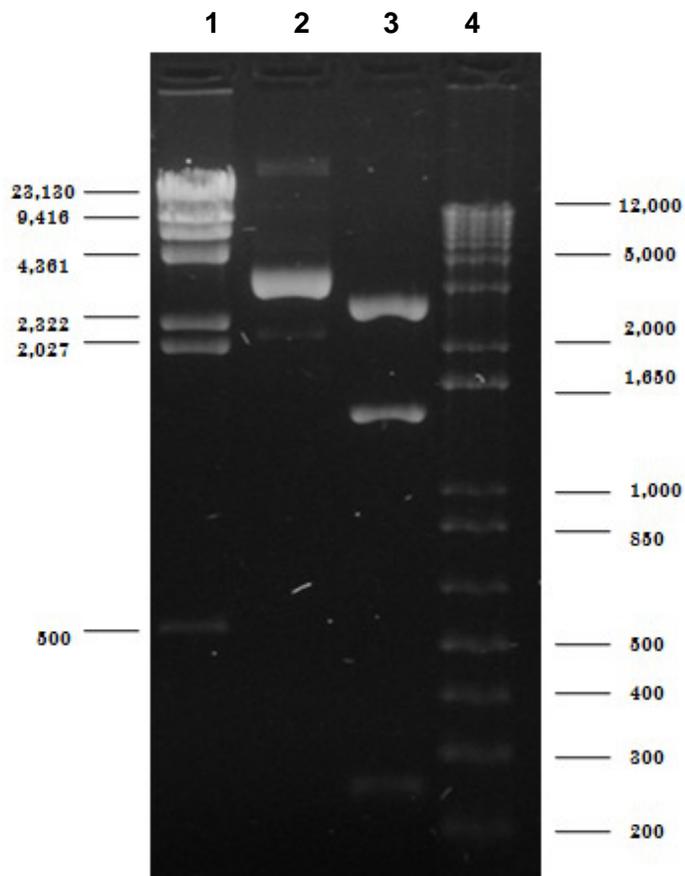
De acuerdo a los datos arrojados por el programa *NEBcutter* 2.0, las bandas esperadas luego de la restricción del vector recombinante pUC13-IDS con la enzima de restricción *EcoRI* deberían ser de 2680, 1430 y 229 pares de bases (pb) como se muestra en la figura 14.

Corte	Terminación	Sitio de corte	Longitud (pb)
1	<i>EcoRI-EcoRI</i>	279-1708	1430
2	<i>EcoRI-EcoRI</i>	1709-1937	229
3	<i>EcoRI-EcoRI</i>	1938-278	2680



**Figura 14.** Restricción virtual de pUC13-IDS con *EcoRI*. Restricción generada con *NEBcutter* donde se predicen tres cortes con la enzima *EcoRI* con tamaños de 2680, 1430 y 229 pb.

A partir de los datos teóricos obtenidos, se procedió a realizar la restricción del vector, donde se corroboró la presencia de las 3 bandas en los pesos esperados (Fig. 15). En trabajos anteriores<sup>7,69</sup>, donde también se realizó restricción del plásmido pUC13-IDS con *EcoRI*, la banda de 229pb no se observa en las electroforesis, probablemente porque su baja talla molecular hace que la molécula migre más rápido a través de la matriz de agarosa<sup>70</sup> y pueda salirse rápidamente del gel.



**Figura 15.** Electroforesis de la restricción de pUC13-IDS con EcoRI en gel de agarosa al 1%. La extracción de pUC13-IDS y la restricción de este vector se analizaron por electroforesis donde los carriles corresponden a las siguientes muestras: 1. Marcador de peso  $\lambda$  HindIII. 2. Vector pUC13-IDS sin digerir. 3. Vector pUC13-IDS digerido con EcoRI (bandas de 2680, 1430 y 229 pb). 4. Marcador de peso 1 Kb Plus.

En el carril 2 de la figura anterior, puede observarse la presencia de varias bandas aún cuando sólo se presenta una especie de ADN, en éste caso pUC13-IDS. Esto puede explicarse debido a las distintas conformaciones que pueden adoptar los plásmidos. La misma secuencia puede estar relajada o en diferentes estados de enrollamiento, como consecuencia, en una electroforesis el movimiento de las moléculas varía de acuerdo a su conformación y las más compactas (superenrolladas) migrarán más rápido a través del gel con respecto a las moléculas relajadas que se moverán lentamente<sup>71</sup>.

### 7.1.2 Obtención del fragmento de IDS sin péptido señal nativo

Luego de la restricción de pUC13-IDS con *EcoRI*, se purificó desde el gel la banda correspondiente al fragmento de 1430pb del ADNc de la IDS y se utilizó como molde para la reacción de PCR. La figura 16A muestra la secuencia teórica obtenida del fragmento de IDS producto de la restricción y los sitios donde hibridan los cebadores en la PCR. En la figura 16B se encuentra la secuencia teórica obtenida del producto de PCR (IDS sin péptido señal nativo). La presencia de este fragmento se evidenció por medio de electroforesis en agarosa donde se observó una banda en la talla teórica esperada, ~1390pb (Fig. 17).

#### A.

```

1 ATGCCGCCAC CCCGGACCGG CCGAGGCCTT CTCTGGCTGG GTCTGGTTCT GAGCTCCGTC
61 TCGGTCGCCC TCGGATCCGA AACGCAGGCC AACTCGACCA CAGATGCTCT GAACGTTCTT
121 CTCATCATCG TGGATGACCT GCGCCCCTCC CTGGGCTGTT ATGGGGATAA GCTGGTGAGG
181 TCCCCAAATA TTGACCAACT GGCATCCCAC AGCCTCCTCT TCCAGAATGC CTTTGCGCAG
241 CAAGCAGTGT GCGCCCCGAG CCGCGTTTCT TTCCTCACTG GCAGGAGACC TGACACCACC
301 CGCCTGTACG ACTTCAACTC CTACTGGAGG GTGCACGCTG GAAACTTCTC CACCATCCCC
361 CAGTACTTCA AGGAGAATGG CTATGTGACC ATGTGCGTGG GAAAAGTCTT TCACCCTGGG
421 ATATCTTCTA ACCATACCGA TGATCTCCG TATAGCTGGT CTTTCCACC TTATCATCCT
481 TCCTCTGAGA AGTATGAAAA CACTAAGACA TGTGAGGGC CAGATGGAGA ACTCCATGCC
541 AACCTGCTTT GCCCTGTGGA TGTGCTGGAT GTTCCCGAGG GCACCTTGCC TGACAAACAG
601 AGCACTGAGC AAGCCATACA GTTGTTGGAA AAGATGAAAA CGTCAGCCAG TCCTTCTTTC
661 CTGGCCGTTG GGTATCATAA GCCACACATC CCCTTCAGAT ACCCCAAGGA ATTTCAGAAG
721 TTGTATCCCT TGGAGAACAT CACCCTGGCC CCCGATCCCG AGGTCCCTGA TGGCCTACCC
781 CCTGTGGCCT ACAACCCCTG GATGGACATC AGGCAACGGG AAGACGTCCA AGCCTTAAAC
841 ATCAGTGTGC CGTATGGTCC AATTCCTGTG GACTTTCAGC GGAAAATCCG CCAGAGCTAC
901 TTTGCCTCTG TGTATATTT GGATACACAG GTCGGCCGCC TCTTGAGTGC TTTGGACGAT
961 CTTAGCTGG CCAACAGCAC CATCATTGCA TTTACCTCGG ATCATGGGTG GGCTCTAGGT
1021 GAACATGGAG AATGGGCCAA ATACAGCAAT TTTGATGTTG CTACCCATGT TCCCCTGATA
1081 TTCTATGTTT CTGGAAGGAC GGCTTCACTT CCGGAGGCAG GCGAGAAGCT TTTCCCTTAC
1141 CTCGACCCTT TTGATTCCGC CTCACAGTTG ATGGAGCCAG GCAGGCAATC CATGGACCTT
1201 GTGGAACCTG TGTCTCTTTT TCCCACGCTG GCTGGACTTG CAGGACTGCA GGTTCACCT
1261 CGCTGCCCGG TTCCTTCATT TCACGTTGAG CTGTGCAGAG AAGGCAAGAA CCTTCTGAAG
1321 CATTTCGAT TCCGTGACTT GGAAGAGGAT CCGTACCTCC CTGGTAATCC CCGTGAACCTG
1381 ATTGCCTATA GCCAGTATCC CCGGCCTTCA GACATCCCTC AGTGGAATTC T

```

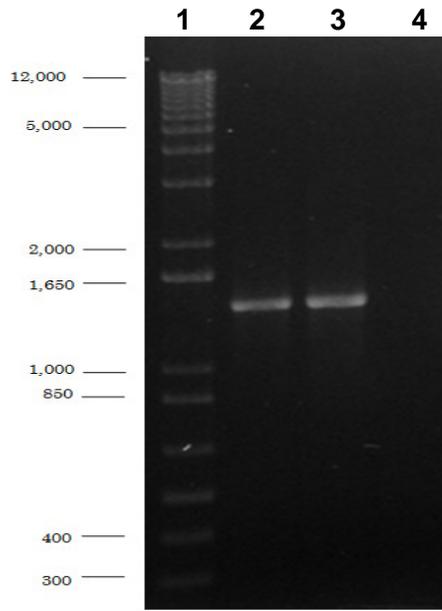
**B.**

```

1  GCTCGAGAAAA GAGAGGCTGA AGCTTCCGAA ACGCAGGCCA ACTCGACCAC AGATGCTCT
61 GAACGTTCTTC TCATCATCGT GGATGACCTG CGCCCCTCCC TGGGCTGTTA TGGGGATAA
121 GCTGGTGAGGT CCCCAAATAT TGACCAACTG GCATCCCACA GCCTCCTCTT CCAGAATGC
181 CTTTGGCGAGC AAGCAGTGTG CGCCCCGAGC CGCGTTTCTT TCCTCACTGG CAGGAGACC
241 TGACACCACCC GCCTGTACGA CTTCAACTCC TACTGGAGGG TGCACGCTGG AACTTCTC
301 CACCATCCCC AGTACTTCAA GGAGAATGGC TATGTGACCA TGTCGGTGGG AAAAGTCTT
361 TCACCCTGGGA TATCTTCTAA CCATACCGAT GATTCTCCGT ATAGCTGGTC TTTTCCACC
421 TTATCATCCTT CCTCTGAGAA GTATGAAAAC ACTAAGACAT GTCGAGGGCC AGATGGAGA
481 ACTCCATGCCA ACCTGCTTTG CCCTGTGGAT GTGCTGGATG TTCCCAGGGG CACCTTGCC
541 TGACAAACAGA GCACTGAGCA AGCCATACAG TTGTTGAAA AGATGAAAAC GTCAGCCAG
601 TCCTTTCTTCC TGGCCGTTGG GTATCATAAG CCACACATCC CCTTCAGATA CCCCAGGA
661 ATTCAGAAAGT TGTATCCCTT GGAGAACATC ACCCTGGCCC CCGATCCCGA GGTCCCTGA
721 TGGCCTACCCC CTGTGGCCTA CAACCCCTGG ATGGACATCA GGCAACGGGA AGACGTCCA
781 AGCCTTAAACA TCAGTGTGCC GTATGGTCCA ATTCCTGTGG ACTTTCAGCG GAAAATCCG
841 CCAGAGCTACT TTGCCTCTGT GTCATATTTG GATACACAGG TCGGCCGCCT CTTGAGTGC
901 TTTGGACGATC TTCAGCTGGC CAACAGCACC ATCATTGCAT TTACCTCGGA TCATGGGTG
961 GGCTCTAGGTG AACATGGAGA ATGGGCCAAA TACAGCAATT TTGATGTTGC TACCCATGT
1021 TCCCCTGATAT TCTATGTTCC TGGAAAGGACG GCTTCACTTC CGGAGGCAGG CGAGAAGCT
1081 TTTCCCTTACC TCGACCCTTT TGATTCCGCC TCACAGTTGA TGGAGCCAGG CAGGCAATC
1141 CATGGACCTTG TGGAACTTGT GTCTCTTTT CCCACGCTGG CTGGACTTGC AGGACTGCA
1201 GGTTCACCTC GCTGCCCCGT TCCTTCATTT CACGTTGAGC TGTGCAGAGA AGGCAAGAA
1261 CCTTCTGAAGC ATTTTCGATT CCGTGACTTG GAAGAGGATC CGTACCTCCC TGGTAATCC
1321 CCGTGAAGTGA TTGCCTATAG CCAGTATCCC CGGCCTTCAG ACATCCCTCA GTGGAATTC
1381 TTAAGCGGCC GCC

```

**Figura 16.** Secuencias teóricas: **A-** producto de restricción; **B-** luego de la reacción de PCR. **A.** Producto de Restricción. La figura muestra en rojo los sitios donde hibridan cebadores y en azul la secuencia que se pierde luego de la reacción y que corresponde a la secuencia del péptido señal heterólogo o nativo. **B.** Producto de PCR. Los nucleótidos coloreados corresponden a la secuencia completa de los primers.



**Figura 17.** Producto de amplificación por PCR del ADNc de la IDS sin la secuencia que codifica para el peptido señal nativo (*hIDS*). Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde los carriles corresponden a las siguientes muestras: 1. Marcador de peso 1 Kb plus. 2 y 3. Producto amplificado del ADNc de la *hIDS* donde se observa una banda de ~1390pb. 4. Control negativo de la reacción de PCR.

## 7.2 SUBCLONACIÓN DEL ADNc DE hIDS

Según lo reportado por Dallas *et al.* (1998), las enzimas de restricción no son lo suficientemente eficientes en los extremos de las secuencias de ADN y necesitan de al menos 3-4 nucleótidos extra en el producto de PCR para que éste pueda ser digerido directamente de forma eficiente (Tabla 3)<sup>72</sup>, otros autores reportan que incluso 3-4 nucleótidos extra pueden ser insuficientes para que se lleve a cabo la digestión enzimática<sup>73</sup>. Por esta razón y teniendo en cuenta que el producto de PCR sólo presenta un nucleótido extra antes del sitio de reconocimiento para las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI* (Fig. 16B) se justifica la estrategia de subclonación del fragmento de hIDS antes de ligarlo al vector pPIC9.

**Tabla 2.** Eficiencia de las enzimas de restricción para cortar los productos de PCR con sitios de reconocimiento en los extremos de los fragmentos. Corta: +, No Corta: -, Corta pero no siempre es reproducible: +/- . Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo para digerir el producto de PCR se encuentran en rojo. Modificado de la referencia 70.

Enzima	Distancia (en pb) desde el final del fragmento			
	0	1	2	3
<i>Apa I</i>	-	-	+/-	+
<i>BamH I</i>	-	+/-	+	+
<i>BstX I</i>	-	+/-	+	+
<i>Cla I</i>	-	+/-	+	+
<i>EcoR I</i>	-	+/-	+	+
<i>EcoR I</i>	-	+	+	+
<i>Hind III</i>	-	-	+	+
<i>Not I</i>	-	-	+	+
<i>Pst I</i>	-	-	+/-	+
<i>Sac I</i>	-	+/-	+	+
<i>Sal I</i>	+	+	+	+
<i>Sma I</i>	-	+/-	+	+
<i>Spe I</i>	+	+	+	+
<i>Xba I</i>	-	+/-	+	+
<i>Xho I</i>	-	-	+/-	+

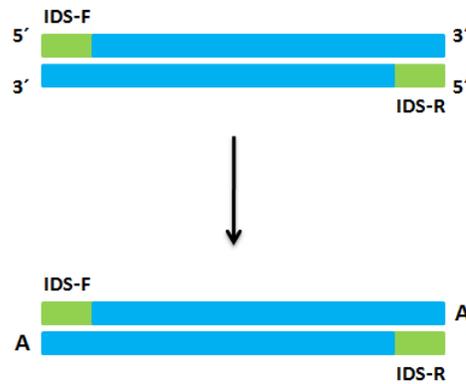
Adicionalmente, con respecto a las características del producto de PCR en los extremos de la secuencia, la literatura reporta que dichos extremos dependen del tipo de polimerasa con la que se realice la reacción. El primer reporte con respecto a este planteamiento lo hizo Clark, J. en 1988, donde se concluyó que la *Taq* polimerasa no necesitaba de ADN molde al final de la cadena y que podía extenderla agregando uno o más nucleótidos en los extremos terminales 3' de una cadena de ADN con extremos romos<sup>74</sup>. Hoy en día, existen varios tipos de ADN polimerasa y los extremos de los fragmentos obtenidos tienen características distintas de acuerdo a la polimerasa que se utilice (Tabla 3).

**Tabla 3.** Comparación de las propiedades de los productos de PCR generados con algunas ADN polimerasas Termostables. En rojo se muestra la polimerasa utilizada en el presente trabajo.

<b>Características</b>	<b><i>Taq</i></b>	<b><i>Tfl</i></b>	<b><i>Tth</i></b>	<b><i>Tli</i></b>	<b><i>Pfu</i></b>
Terminación resultante	<b>3' A</b>	<b>3' A</b>	<b>3' A</b>	<b>Romo</b>	<b>Romo</b>
5' - 3' actividad exonucleasa	Si	Si	Si	No	No
3' - 5' actividad exonucleasa	No	No	No	Si	Si

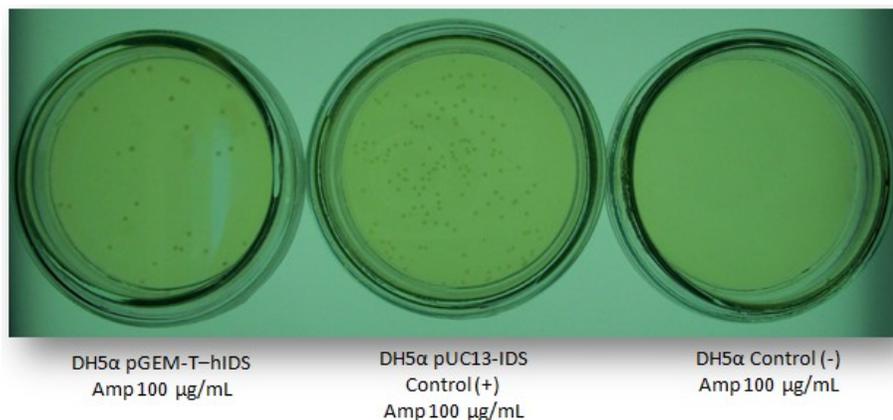
En una reacción de PCR donde se encuentran los cuatro dNTPs, el nucleótido que tiende a ser agregado de más es el desoxiadenuilato, es decir que el producto obtenido en éste trabajo contiene en sus extremos 3' un desoxiadenuilato extra como se representa en la figura 18.

Hace algunos años se diseñó una técnica denominada clonación T- A<sup>75</sup>. Para la cual se diseñaron plásmidos abiertos que presentan desoxitimidilatos protuberantes en sus extremos 3' (Vector T), lo que permite que sean compatibles para ligar con productos de PCR obtenidos con ADN polimerasas que produzcan extremos con desoxiadenuilatos libres en los extremos 3' de las secuencias<sup>74,76</sup>. Como se describió en el numeral 6.3.2, el vector pGEM®-T Easy de Promega es un sistema T de clonación que presenta desoxitimidilatos sobresalientes en sus extremos 3', con lo que se incrementa fuertemente la ligación de productos obtenidos por PCR, además de disminuir las probabilidades de recirculación del vector ya que sus extremos no son compatibles<sup>65</sup>.



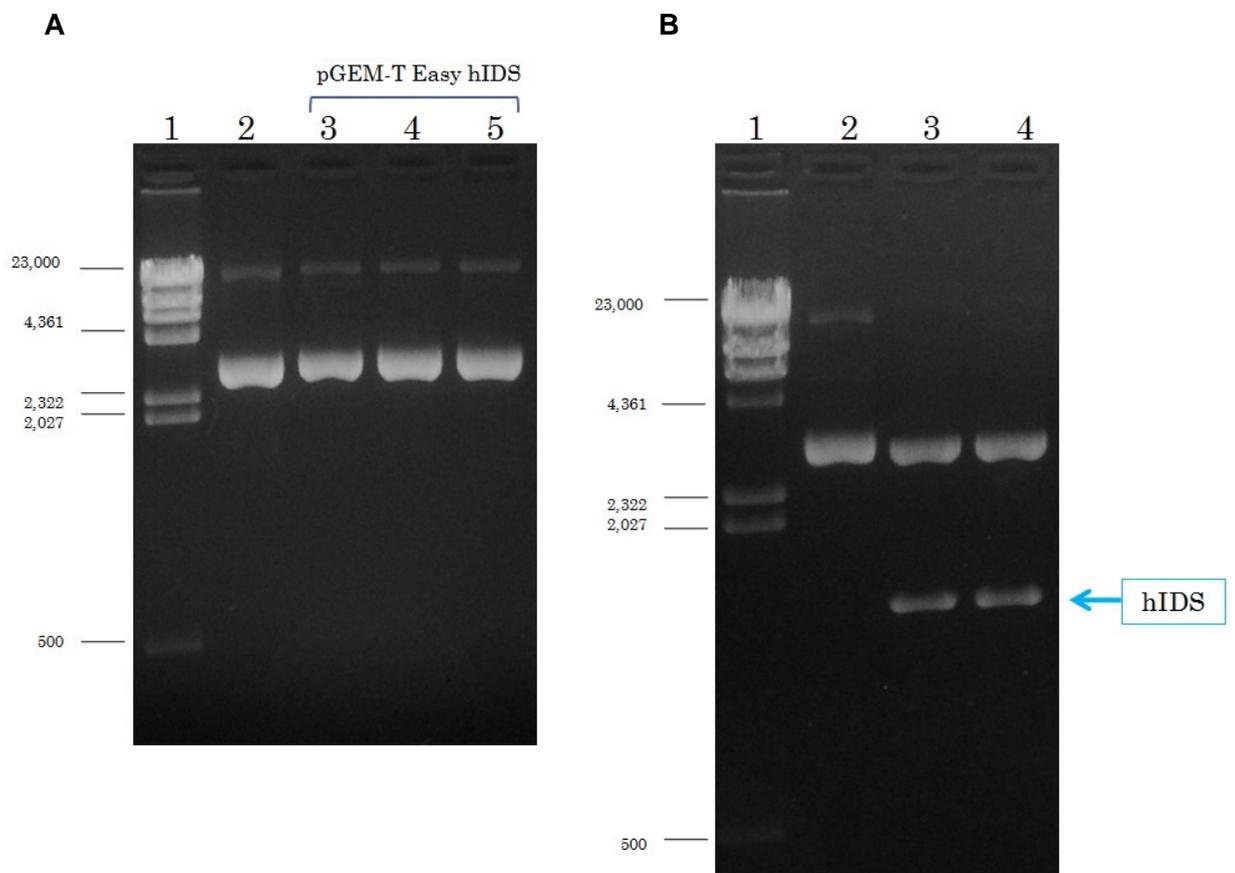
**Figura 18.** Características de los extremos del producto de PCR. Esquema representativo donde se muestra la ubicación de los cebadores (IDS-F e IDS-R) en la secuencia y los extremos 3' con desoxiadenilatos protuberantes.

En cuanto a los resultados luego de la transformación de las bacterias competentes con el vector pGEM®-T Easy- hIDS, se obtuvieron alrededor de 30 colonias transformantes por caja de petri (Fig. 19). En éste caso la selección no se realizó de acuerdo al color de las colonias (Blanco: colonias con el inserto, Azul: colonias con el vector recircularizado) ya que el medio en el que fueron cultivadas sólo presentaba como mecanismo de selección Ampicilina a una concentración de 100µg/mL. Por esta razón, se aislaron todas las colonias presentes y se realizó extracción de plásmidos para luego probar la presencia del inserto mediante una reacción de restricción con las enzimas *XhoI* y *NotI*. Adicionalmente, el hecho de liberar el fragmento de hIDS con estas enzimas proporcionaba un inserto adecuado para luego ser ligado al vector pPIC9, ya que los fragmentos a unir (vector e inserto) presentan extremos complementarios.



**Figura 19.** Resultado de la transformación de *E. coli* con el constructo pGEM-T Easy-h IDS.

Inicialmente, se aislaron cinco colonias, a tres de ellas se les realizó extracción de plásmidos que se denominaron pGEM-T Easy/hIDS clones 1, 2 y 3. Teniendo en cuenta que el vector tiene un peso de 3018pb, el peso esperado para los clones con el inserto sería de ~4408pb, lo que podría compararse con el peso del vector pUC13-IDS de 4339pb que se muestra en la figura 12, esperando un patrón de corrido a través del gel muy similar entre ambos constructos (Fig. 20A). Al llevar a cabo la restricción de los clones 1 y 2 con las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI* seguida de una electroforesis, se evidenció la liberación del fragmento hIDS (Fig. 20).

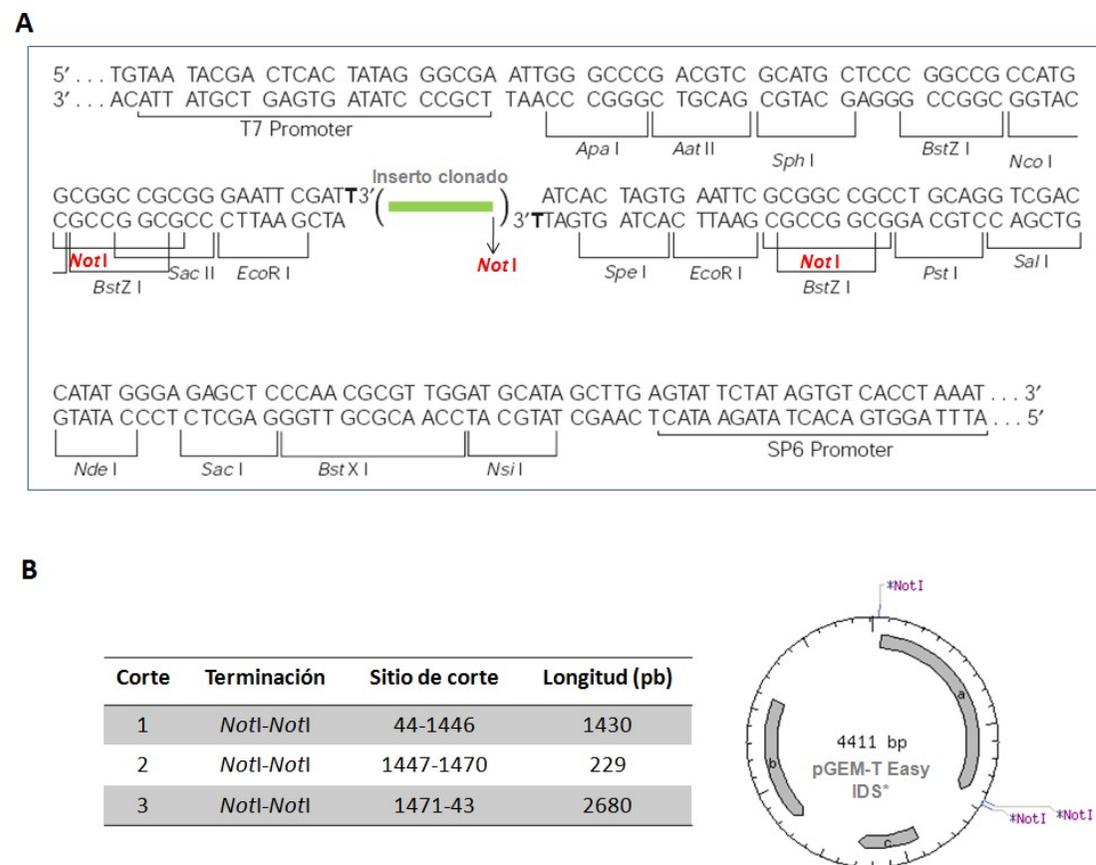


**Figura 20.** Electroforesis de pGEM-T Easy-hIDS y Restricción con *XhoI* y *NotI*. **A.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde los carriles corresponden a las siguientes muestras: **1.** Marcador de peso  $\lambda$  *HindIII*. **2.** pUC13-IDS (control positivo de la transformación). **3, 4 y 5.** pGEM-T Easy- hIDS clones 1, 2 y 3 respectivamente. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde los carriles corresponden a las siguientes muestras: **1.** Marcador de peso  $\lambda$  *HindIII*. **2.** pGEM-T Easy- hIDS clon 1. **3 y 4.** Restricción de pGEM-T Easy- hIDS clon 1 con las enzimas *XhoI* y *NotI* donde aparece la banda de la hIDS.

### 7.2.3 Ligación del fragmento hIDS al vector pPIC9

De acuerdo a los resultados obtenidos en la subclonación de hIDS, se realizó la ligación de hIDS en pPIC9, el vector y el inserto se prepararon de acuerdo a lo descrito en el numeral 6.8, donde el inserto se obtuvo a partir de la digestión del constructo pGEM-T/hIDS.

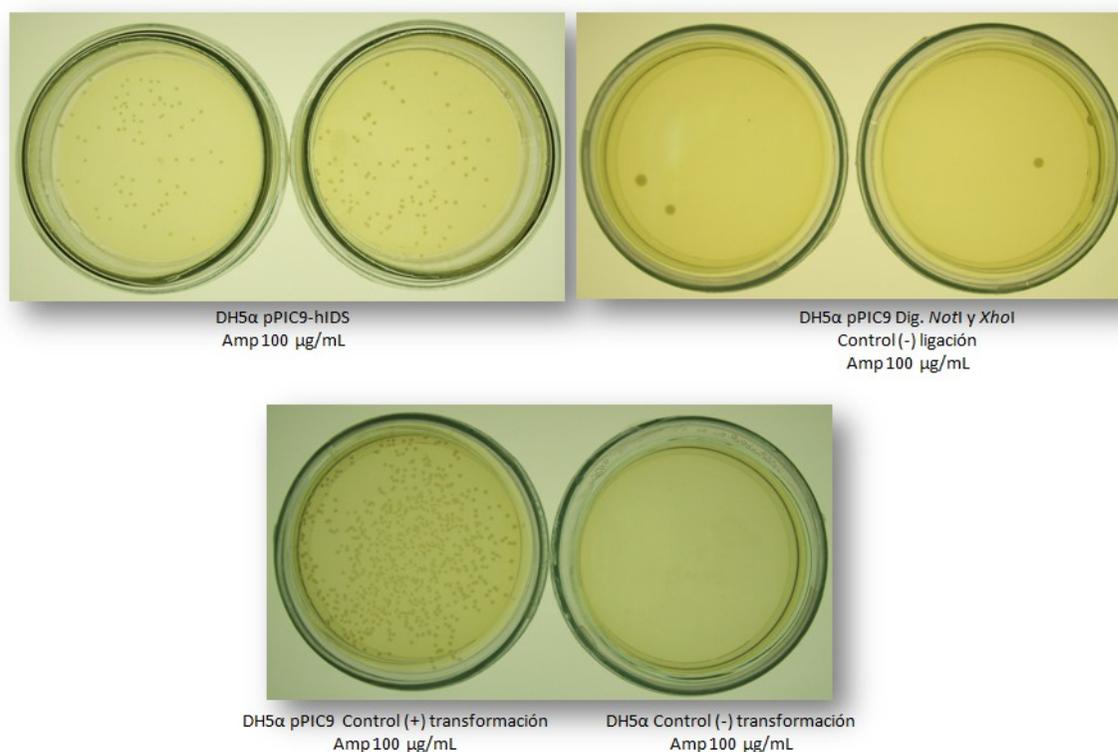
Según los datos obtenidos en el análisis del constructo pGEM-T *Easy* hIDS con el programa *NEBcutter*, se encontró que presenta tres sitios de reconocimiento para la enzima *NotI* en el sitio múltiple de clonación; dos en el vector y uno generado por el cebador IDS-R (Tabla 1) usado para obtener la secuencia de la hIDS (Figuras 21A-B).



**Figura 21.** Sitios de restricción con *NotI* de pGEM-T *Easy* y pGEM-T *Easy-hIDS*. **A.** Sitio múltiple de clonación del vector pGEM-T *Easy* donde se muestran en rojo los sitios de reconocimiento para la enzima *NotI* que flanquean el sitio donde liga el inserto (en verde) y la ubicación del sitio de restricción en el mismo. **B.** Restricción virtual del constructo pGEM-T *Easy-hIDS*, donde se muestran tres sitios de corte para la enzima *NotI*.

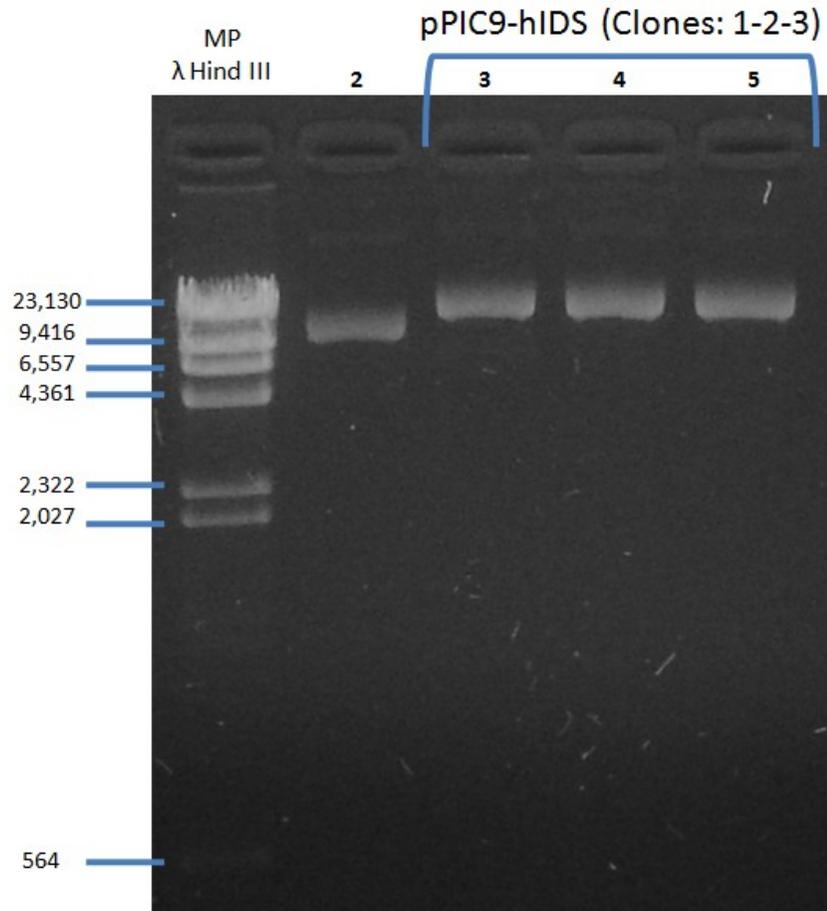
Por esta razón, se realizó una digestión del vector con cada enzima por separado<sup>67</sup>, es decir, realizar una digestión con *Xho*I en primera instancia, seguida de una digestión con *Not*I tomando como muestra de ADN la primera digestión para completar los dos extremos adecuados para la ligación.

Los resultados obtenidos en este punto (figura 22) fueron acordes con los resultados esperados, donde de acuerdo a lo que reporta *Sambrook et al.* (1989)<sup>67</sup>, ante la falta de complementariedad entre los extremos sobresalientes producto de una digestión con enzimas distintas (*Not*I y *Xho*I), el vector no se puede ligar eficientemente y transforma las bacterias pobremente<sup>67</sup> (transformación con el control negativo de la ligación). Esto, contrastado con los resultados de la transformación con la reacción de ligación entre pPIC9 e hIDS donde se obtuvo una cantidad de colonias visiblemente mayor indica que la mayoría de las células bacterianas resistentes a la ampicilina contienen plásmidos que llevan el ADN de interés (hIDS).



**Figura 22.** Resultado de la transformación de *E. coli* DH5α con el constructo pPIC9-hIDS.

Se aislaron 20 colonias nombradas pPIC9-hIDS clones 1 a 20. Inicialmente, se probaron los clones 1, 2 y 3 realizando una extracción de plásmidos, los resultados obtenidos se muestran en la figura 23.

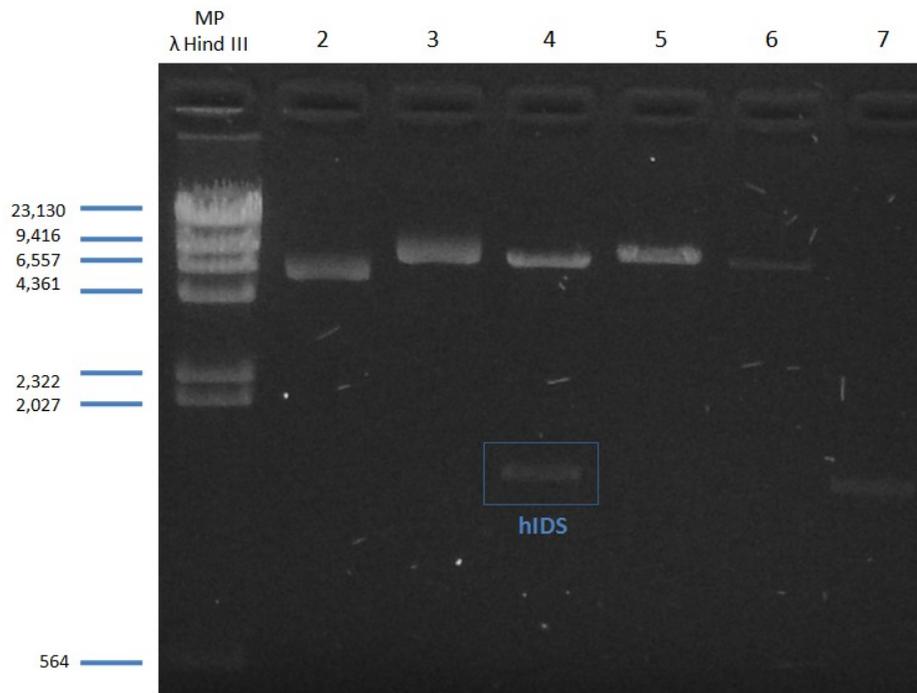


**Figura 23.** Producto de extracción de pPIC9-hIDS. Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde los carriles corresponden a las siguientes muestras: 1. Marcador de peso λ HindIII. 2. Extracción de plásmidos de pPIC9. 3, 4 y 5. Extracción de plásmidos de los clones pPIC9-hIDS 1, 2 y 3 respectivamente.

De acuerdo al principio de separación de las bandas en una electroforesis por su talla molecular, donde las moléculas que tienen la misma longitud migran juntas como una sola banda y la moléculas más pequeñas se mueven a través de la matriz del gel más rápidamente que las grandes<sup>70</sup>, se explica la diferencia en las distancias de corrido de la figura 23 mostrando una talla mayor en las extracciones de ADN plasmídico de los clones

1, 2 y 3 comparadas con la extracción de pPIC9 (8020pb), sugiriendo la presencia del inserto (hIDS) en el vector pPIC9, constructo denominado pPIC9-hIDS (~9410pb).

Asumiendo que los clones pPIC9-hIDS 1, 2 y 3 contenían el inserto, se probó el clon 1 por restricción con las enzimas *XhoI* y *NotI* en las mismas condiciones descritas en el numeral 6.8.1 con el fin de corroborar la presencia del inserto. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 24.



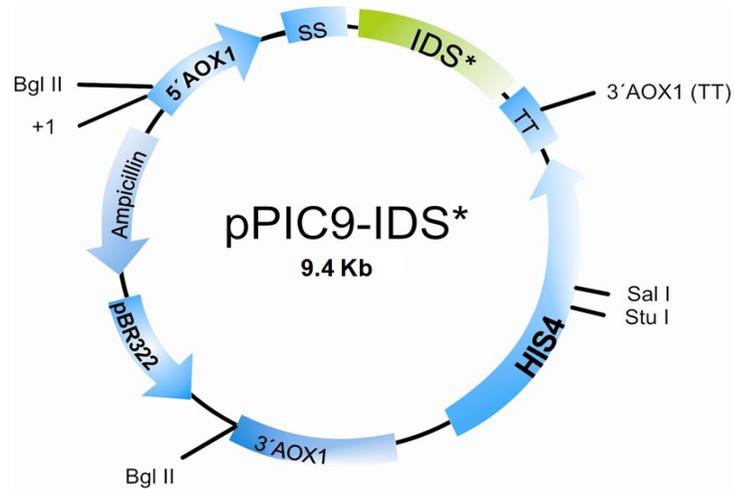
**Figura 24.** Restricción del constructo pPIC9-hIDS con las enzimas *XhoI* y *NotI*. Para comprobar la presencia del inserto en el constructo, se analizó el producto de restricción en un gel de agarosa al 1%. Los carriles corresponden a las siguientes muestras: **1.** Marcador de peso  $\lambda$  *HindIII*. **2.** Extracción de pPIC9. **3.** Extracción de pPIC9-hIDS clon 1. **4.** Restricción de pPIC9-hIDS con *XhoI* y *NotI*. **5.** Restricción de pPIC9-hIDS con *XhoI*. **6 y 7.** Muestras utilizadas para la ligación y construcción del vector recombinante: pPIC9 e hIDS respectivamente (productos purificados luego de la restricción con *XhoI* y *NotI*).

### 7.3 SECUENCIA DE hIDS

La secuencia consenso obtenida en la reacción de secuenciación se comparó utilizando el programa ClustalW<sup>77</sup> con la secuencia correspondiente al primer reporte del ADN complementario de la IDSh<sup>78</sup> (código de acceso en el *GeneBank* M58342). La homología



Finalmente, la figura 26 muestra el esquema propuesto del constructo pPIC9-hIDS obtenido en el presente trabajo donde se observa la ubicación del fragmento de hIDS entre la señal de secreción  $\alpha$ -Factor (ss) y el sitio de terminación de la transcripción (TT).



**Figura 26.** Esquema propuesto del vector recombinante pPIC9-hIDS.

## 8. CONCLUSIONES

- Se obtuvo el ADNc de IDSh sin la secuencia que codifica para el péptido señal nativo.
- Se logró la clonación direccional del ADNc de la IDSh, gracias a la modificación de los extremos del ADNc con la adición de sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI*.
- Se obtuvieron clones DH5 $\alpha$ /pPIC9-hIDS positivos.
- La construcción realizada en el presente trabajo es la primera en la que se elimina la secuencia que codifica para el péptido señal nativo del ADNc de la IDSh, para clonarla en un vector de expresión para levaduras.
- La estrategia estandarizada para la clonación de productos de PCR planteada en este trabajo, servirá como referencia para los próximos trabajos que se realicen por el Grupo de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas (GECAVYME) de la Universidad del Quindío.

## 9. RECOMENDACIONES

Cuando se realizan clonaciones de ADN producto de una reacción de PCR se deben tener en cuenta tanto las características de los extremos en los fragmentos obtenidos de acuerdo a la ADN polimerasa que se utilice, como las del vector a utilizar para hacer un diseño metodológico adecuado.

Realizar la transformación de la levadura *Pichia pastoris* con el constructo pPIC9-hIDS con el fin de expresar la proteína recombinante.

Evaluar la actividad enzimática de la hIDS para adelantar estudios comparativos con las construcciones genéticas de trabajos anteriores.

Ya que en trabajos anteriores realizados en *E. coli* y *P. pastoris* la enzima recombinante aún no cumple con los requerimientos óptimos para obtener cantidades clínicamente útiles, se sugiere clonar la hIDS en un vector de expresión para *E. coli* con el fin de comparar los resultados de expresión en levaduras y bacterias.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- 
- <sup>1</sup> **Neufeld, EF. & Muenzer, J.** Mucopolysaccharidoses in: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. Scriver, C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. & Valle D. (eds). McGraw-Hill. New York. 2001; 3421-52.
- <sup>2</sup> **Barrera, L., Sáenz, H. & Cuellar, M.** (Eds). *Manual de Enfermedades Metabólicas*. Pontificia Universidad Javeriana. 2004; pp. 235-37.
- <sup>3</sup> **Lanpher, B., Brunetti, N. & Lee, B.** Inborn Errors of Metabolism: The flux from Mendelian to complex diseases. *Nature Reviews/Genetics*. 2006; 7:449-60.
- <sup>4</sup> **Muenzer, J., Wraith, J., Beck, M., Giugliani, R., Harmatz, P., Eng, C., Vellodi, A., Martin, R., Ramaswami, U., Guzsavas, M., Vijayaraghavan, S., Wendt, S., Puga, A., Ulbrich, B., Shinawi, M., Cleary, M., Piper, D., Conway, A. & Kimura, A.** A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genetics in Medicine*. 2006; 8:465-73.
- <sup>5</sup> **Desnick, R.** Enzyme replacement and enhancement. *Therapies for lysosomal diseases*. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2004; 27:385-410.
- <sup>6</sup> **Werber, Y.** Lysosomal Storage Diseases Market. *Nature Reviews: Drug Discovery*. 2004; 3:9-10.
- <sup>7</sup> **Landazuri, P.** Clonación del cDNA de la Iduronato 2-Sulfato Sulfasa Humana. Expresión de la Enzima en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*. Instituto de errores Innatos del Metabolismo. Tesis Doctoral. 2002. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. 115 p.
- <sup>8</sup> **Barragán, C., Sáenz, H., Poutou, R., Córdoba, H., Mercado, M. & Barrera, L.** Influencia del  $\alpha$ -Factor sobre la expresión de IDShr en *Pichia pastoris*: Revisión sistemática de literatura y análisis computacional. *NOVA*. 2005; 3:80-91.
- <sup>9</sup> **Roy, N., Padmanabhan, S., Smith, M., Shi, L., Navre, M. & Das, G.** Expression of Human Gelatinase B in *Pichia pastoris*. *Prot Exp Purif.* 1999; 16: 324-30.
- <sup>10</sup> **Koganesawa N, Aizawa T, Masaki K, Matsuura A, Nimori T, Bando H, Kawano K, Nitta K.** Construction of an Expression System of Insect Lysozyme Lacking Thermal Stability: The Effect of Selection of Signal Sequence on Level of Expression in the *Pichia pastoris* Expression System. *Prot Eng.* 2001; 14: 705-10.
- <sup>11</sup> **Sáenz, H. & Barrera, L.** La Terapia de Reemplazo Enzimático en el Tratamiento de Enfermedades Genéticas. *Univ Scient* 2003; 8: 31-42.
- <sup>12</sup> **Córdoba, H., Poutou, R. & Barrera, L.** *Pichia pastoris*: una Alternativa para la Producción de Glicoproteínas Humanas de Uso Terapéutico. *Estrategias de Fermentación*. *Rev Col Biotecnol.* 2003; 5:73-84.
- <sup>13</sup> **Sáenz, H.** Expresión, purificación parcial y estudios computacionales de la IDShr producida en *Pichia pastoris*. (Tesis Doctoral). Bogotá D.C.: Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana; 2005.
- <sup>14</sup> **Kjeldsen T, Frost Petterson A, Hach M.** The Role of Leaders in Intracellular Transport and Secretion of the Insulin Precursor in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol.* 1999; 75: 195-208.

- 
- <sup>15</sup> **Garrod, A.** *The Croonian lectures on inborn errors of metabolism, lecture II: alkaptonuria.* *Lancet.* 1908; 2:73-79.
- <sup>16</sup> **Sánchez, M., Legarda, M. & Dalmau, J.** *Errores Innatos del Metabolismo: Aproximación Diagnóstica en Atención Primaria.* *Biol Pediatr.* 2007; 47:111-15.
- <sup>17</sup> **Menendez, C., Zaldívar, C. & González, A.** *Errores innatos del metabolismo. Enfermedades lisosomales.* *Rev Cubana Pediatr.* 2002; 74:68-67.
- <sup>18</sup> **Ruiz M. & Santana C.** *Enfoque práctico para el diagnóstico de los errores congénitos del metabolismo.* *Acta Pediátrica Española.* 1998; 56:39-52.
- <sup>19</sup> **Scriver, C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. & Valle D.** (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases.* McGraw-Hill. New York. 2001; 3421-52.
- <sup>20</sup> **Meikle, P., Hopwood, J., Clague, A. & Carey, W.** *Prevalence of Lysosomal Storage Disorders.* *JAMA.* 1999; 281:249-54.
- <sup>21</sup> **Sawkar, A., Haeze, W. & Kelly, W.** *Therapeutic Strategies to Ameliorate Lysosomal Storage Disorders- A Focus on Gaucher Disease.* *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2006; 63:1179-92.
- <sup>22</sup> **Futerman, A. & Meer, G.** *The Cell Biology of Lysosomal Storage Disorders.* *Nature Reviews: Molecular Cell Biology.* 2004; 5:554-65.
- <sup>23</sup> **Neufeld, E.** *Lysosomal Storage Diseases.* *Annual Reviews of Biochemistry.* 1991; 60:257-80.
- <sup>24</sup> **Neufeld, E., Lim, T. & Shapiro, L.** *Inherited Disorders of Lysosomal Metabolism.* *Annual Reviews of Biochemistry.* 1975; 44:357-76.
- <sup>25</sup> **Menendez, C., González, S., Zaldívar, C. & González, M.** *Mucopolisacaridosis con Afectaciones del Sistema Nervioso.* *Revista Mexicana de Neurociencia.* 2006; 7(2):150-155.
- <sup>26</sup> **Muenzer J.** *Mucopolysaccharidoses.* *Adv Pediatr.* 1986; 33:269-302
- <sup>27</sup> **Wraith, J.** *Mucopolysaccharidoses and Oligosaccharidoses in: Inborn Metabolic Diseases – Diagnosis and Treatment.* Fernandes, J., Saudubray, M., Berghe, G. & Walter, J. (eds). 4th Ed. Springer Germany. 2006; 496-507.
- <sup>28</sup> **Neufeld, EF. & Muenzer, J.** *Mucopolysaccharidoses in: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases.* Scriver, C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. & Valle D. (eds). McGraw-Hill. New York. 2001; 3421-52.
- <sup>29</sup> **Hunter, C.** *A Rare Disease in Two Brothers.* *Proceedings of the Royal Society of Medicine.* 1917; 10:104-16.
- <sup>30</sup> **Sukegawa, K., Kato, Z., Nakamura, H., Tomatsu, S., Fukao, T., Kuwata, K., Orii, T. & Kondo, N.** *Effect of Hunter disease (Mucopolysaccharidosis tipe II) mutations on molecular phenotypes of iduronate-2-sulfatase: Enzymatic activity, protein processing and structural analysis.* *Journal of Inherited Metabolic Diseases.* 2006; 29:755-61.
- <sup>31</sup> **Schaap, T. & Bach, G.** *Incidence of Mucopolysaccharidoses in Israel: Is Hunter Disease a “Jewish Disease”?.* *Human Genetics.* 1980; 56:221-23.
- <sup>32</sup> **Young, I. & Harper, P.** *Incidence of Hunter’s Disease.* *Human Genetics.* 1982; 60:391-92.

- 
- <sup>33</sup> **Lowry R, Applegarth D, Toone J, MacDonald E & Thunem N.** An update on the frequency of mucopolysaccharidoses syndrome in British Columbia. *Human Genet.* 1990; 85:389-90.
- <sup>34</sup> **Poorthuis, B., Wevers, A., Kleijer, W., Groener, J., de Jong, J., van Weely, S., Niezen-Koning, K & van Diggelen, O.** The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Human Genetics.* 1999; 105:151-56.
- <sup>35</sup> **Wraith, J., Scarpa, M., Beck, M., Bodamer, O., Meirleir, L., Guffon, N., Lund, A., Malm, G., Van der Ploeg, A. & Zeman, J.** Mucopolysaccharidosis tipe II (Hunter Syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *European Journal of Pediatrics.* 2008; 167:267-77.
- <sup>36</sup> **Parenti, G., Meroni, G. & Ballabio, A.** The sulfatase gene family. *Current Opinion in Genetics & Development.* 1997; 7: 386-91.
- <sup>37</sup> **Von Figura, K, Schmidt, B., Selmer, T. & Dierks, T.** A novel protein modification generating an aldehyde group in sulfatases: its role in catalysis and disease. *BioEssays.* 1998; 20:505-10.
- <sup>38</sup> **Dierks, T., Lecca, R., Schlatterhose, P., Schmidt, B. & von Figura, K.** Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukariotic sulfatases. *The EMBO Journal.* 1999; 18:2084-91.
- <sup>39</sup> **Waldow, A., Schmidt, B., Dierks, T., von Bülow, R. & von Figura, K.** Amino acid residues forming the active site of Arylsulfatase A. *The Journal of Biological Chemistry.* 1999; 274:12284-88.
- <sup>40</sup> **Schmidt, B., Selmer, T., Ingendoh, A. & von Figura, K.** A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in Multiple Sulfatase Deficiency. *Cell.* 1995; 82:271-78.
- <sup>41</sup> **Millat, G., Froissart, R., Maire, I. & Bozon, D.** Characterization of iduronate sulphatase mutants affecting N-glycosylation sites and the cysteine-84 residue. *Biochemistry Journal.* 1997; 326:243-47.
- <sup>42</sup> **Sáenz, H., Lareo, L., Poutou, T., Sosa, A. & Barrera, L.** Predicción computacional de la estructura terciaria de la iduronato 2-sulfato sulfatasa humana. *Biomédica.* 2007; 27:7-20.
- <sup>43</sup> **Millat G., Froissart R., Maire I., and Bozon D.** IDS transfer from overexpressing cell to IDS-deficient cell. *Exp Cell Research.* 1997; 230: 362-77.
- <sup>44</sup> **Wilson P., Morris C., Anson D., Occhiodoro T., Bielicki J., Clements P. & Hopwood J.J.** Hunter syndrome: Aislation of an iduronate 2-sulfatase cDNA clone and analysis of patients DNA. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1990; 87:8531-35.
- <sup>45</sup> **Rathmann M., Bunge Steglich C., Schwinger E., Gal A.** Evidence for an iduronate sulfatase pseudogen near de functional Hunter syndrome gen. *Human Genetic.* 1995; 95: 34-38.
- <sup>46</sup> **Cudry S., Froissart R., Bouton O., Maire I. & Bozon D.** The 2.1-5.4 and 5.7kb transcripts of the IDS gene are generated by different polyadenylation signals. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1447:35-42.
- <sup>47</sup> **Malmgren H., Calberg B., Peterson U. & Bondeson M.** Identificati3n of an alternative transcript from the human iduronate 2-sulfatase. *Genomics.* 1995; 29:291-93.
- <sup>48</sup> **Vellodi A., Young E., Cooper A., Lidchi V., Winchester B. & Wraith J.** Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease. *J Inherit Metab Dis.* 1999; 22:638-48.
- <sup>49</sup> **Kaye E.** Lysosomal Storage Diseases. *Curr Treat Options Neurol.* 2001; 3:249-56.

- 
- <sup>50</sup> **Brown F., Hall C., Neufeld E., Muñoz L., Braine H., Andrzejewsky S., Camargo E., Mark S., Richard J. & Moser H.W.** Administration of iduronate sulfatase by plasma exchange to patients with Hunter syndrome. A clinical study. *Am J Med Gen.* 1982; 13: 308-09.
- <sup>51</sup> **Dean M., Stevens R., Muir H., Benson P., Button L., Anderson R., Bolyston A. & Mowbrady J.** Enzyme replacement therapy by fibroblast transplantation: Long-Term biochemical study in three cases of hunter's syndrome. *J Clin Inves.*, 1979; 63:138-45.
- <sup>52</sup> **Barrera, L.,** Editorial, Los errores innatos del metabolismo, fuente inagotable de conocimiento médico por más de un siglo, siguen sin diagnosticarse y tratarse en Colombia. *Revista NOVA.* 2005; 3:13-17.
- <sup>53</sup> **Muenzer, J., Wraith, J., Beck, M., Giugliani, R., Harmatz, P., Eng, C., Vellodi, A., Martin, R., Ramaswami, U., Guzsavas, M., Vijayaraghavan, S., Wendt, S., Puga, A., Ulbrich, B., Shinawi, M., Cleary, M., Piper, D., Conway, A. & Kimura, A.** A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter síndrome). *Genetics in Medicine.* 2006; 8:465-73.
- <sup>54</sup> **Muenzer, J., Guzsavas, M., McCandless, S., Schuetz, T. & Kimura, A.** A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter síndrome). *Molecular Genetics and Metabolism.* 2007; 90:329-37.
- <sup>55</sup> **García, A., DaCosta, J., Pan, J., Muenzer, J. & Lamsa, J.** Preclinical dose ranging studies for enzyme replacement therapy with idursulfase in a knock-out mouse model of MPS II. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2007; 91:183-90.
- <sup>56</sup> **O'Connor, T. & Crystal, R.** Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nature Reviews/Genetics.* 2006; 7:261-76.
- <sup>57</sup> **Zoltick P. & Wilson J.** Regulated gene expression in gene therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 953:53-63.
- <sup>58</sup> **Pichia pastoris expression system, version M.** Instruction Manual (Invitrogen CA).
- <sup>59</sup> **Córdoba H., Poutou R. & Barrera L.** Pichia pastoris: una Alternativa para la Producción de Glicoproteínas Humanas de Uso Terapéutico. *Estrategias de Fermentación. Rev Col Biotecnol.* 2003; 5: 73-84.
- <sup>60</sup> **Hollenberg C. & Gellissen G.** Production of Recombinant Proteins by Methylophilic Yeast. *Curr Opin Biotechnol.* 1997; 8: 554-60.
- <sup>61</sup> **Cereghino J. & Cregg J.** Heterologous Protein Expression in the Methylophilic Yeast Pichia pastoris. *FEMS Microbiol Rev.* 2000; 24: 45-66.
- <sup>62</sup> **Kurjan J. & Herskowitz I.** Structure of a Yeast Pheromone Gene (MF alpha): a Putative alpha-factor Precursor Contains Four Tandem Copies of Mature alpha-factor. *Cell.* 1982; 30: 933-43.
- <sup>63</sup> **Caplan S, Green R, Rocco J. & Kurjan J.** Glycosylation and Structure of the Yeast MF Factor Precursor Is Important for Efficient Transport Through the Secretory Pathway. *J Bacteriol.* 1991; 173: 627-35.
- <sup>64</sup> **Barragán, C., Sáenz, H., Poutou, R., Córdoba, H., Mercado, M. & Barrera, L.** Influencia del  $\alpha$ -Factor sobre la expresión de IDShr en *Pichia pastoris*: Revisión sistemática de literatura y análisis computacional. *NOVA.* 2005; 3:80-91.
- <sup>65</sup> **pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vecto Systems.** Technical Manual No. 042. Promega.

- 
- <sup>66</sup> **Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R.J.** NEButter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 3688-91.
- <sup>67</sup> **Sambrook J. Fritsch E.F., Maniatis T.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed.* Cold Spring Harbor Laboratory press, N.Y. 1989.
- <sup>68</sup> **Sanger S. & Coulson A.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad USA.* 1977; 74:5463.
- <sup>69</sup> **Morales, E.** *Clonación, Expresión, Actividad Enzimática y Purificación de Iduronato 2 Sulfato Sulfatasa Humana Recombinante Expresada como Proteína de Fusión en Escherichia coli. Grupo de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas. Tesis de Maestría. 2007. Universidad del Quindío. 45 p.*
- <sup>70</sup> **Lodish, H., Berk, A., Paul, M., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Sipursky, L. & Darnell, J.** (Eds). *Biología Celular y Molecular.* 5ª edición. Buenos Aires: Médica Panamericana. 2005; Pag 371.
- <sup>71</sup> **Nelson, D. & Cox, M.** (Eds). *Genes and Chromosomes in: Lehninger- Principles of Biochemistry.* 4<sup>th</sup> Edition. 2005; 930-35.
- <sup>72</sup> **Dallas, Q., Jiang, G. & Sladek, F.** Digestion of terminal restriction endonuclease recognition sites on PCR products. *Bio Techniques.* 1998; 24:582-84.
- <sup>73</sup> **Jung, V., Pestka, SB. & Pestka S.** Efficient cloning of PCR generated DNA containing terminal restriction endonuclease recognition sites. *Nucleic Acid Research.* 1990; 18:6156.
- <sup>74</sup> **Clark, J.** A novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acid Research.* 1988; 16:9677-86.
- <sup>75</sup> **Mead, D., Pey, K., Herrnstadt, C., Marcil, R. & Smith, L.** A Universal Method for the Direct Cloning of PCR Amplified Nucleic Acid. *Nucl. Nature/BioTechnology.* 1991; 9: 657-63.
- <sup>76</sup> **Zhou, M. & Gomez, C.** Universal TA Cloning. *Current Issues in Molecular Biology.* 2000; 2:1-7.
- <sup>77</sup> **Lopez R., Services Programme and Lloyd A.** (1997). *ClustalW Service at the European Bioinformatics Institute* [en línea]: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>
- <sup>78</sup> **Wilson, P., Morris, C., Anson, T., Occhiodoro, J., Bielicki, P., Clements, P. & Hopwood, J.** Hunter síndrome: Isolation of an Iduronate-2-sulfatase cDNA clone and analysis of patient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:8531-35.

---

# ***ANEXOS***

---

## ANEXO 1:

### Protocolo de extracción de plásmidos (*Wizard®Plus SV Minipreps* de Promega)

#### **Preparación**

1. Precipitar las células **5 min a 10.000 g** (volumen 1-10 ml de cultivo). (Max vel en microcentrífuga).
2. Suspender el precipitado en **250 µL** de sln de *resuspensión*.
3. Agregar **250 µL** de la solución de *lisis* e invertir 4 veces para mezclar.
4. Agregar **10 µL** de la solución de *Proteasa Alcalina*; invertir 4 veces para mezclar. *Incubar 5 min a °T ambiente*.
5. Agregar **350 µL** de la solución de *neutralización* e invertir 4 veces para mezclar.
6. Centrifugar **10 min a 10.000 g** (Max vel en microcentrífuga).

#### **Purificación del ADN plasmídico**

7. Insertar la columna de extensión a un tubo de microcentrífuga de 2ml.
8. Transferir cuidadosamente el lisado del **paso 5** a la minicolumna.
9. Centrifugar a **máx. vel.** por **1 min.** en la microcentrífuga. Descartar el filtrado y reinsertar la columna al tubo.

#### **Lavado**

10. Agregar **750 µL** de la *solución de lavado* que contiene etanol. Centrifugar a **máx. vel.** por **1 min.** Descartar el filtrado y reinsertar la columna al tubo de colección.
11. Repetir el paso anterior con **250 µL** de la *solución de lavado*.
12. Centrifugar a **máx. vel.** por **2 min.** a *°T ambiente*.

*Nota: reposar 10min para eliminar el exceso de etanol.*

#### **Limpieza**

13. Transferir la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga.

*Nota: tener cuidado en no transferir solución de lavado junto con la columna. Si la columna tiene solución de lavado asociada, centrifugar nuevamente por 1 min. a máx. vel., luego transferir la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga.*

14. Agregar **100 µL** de agua libre de nucleasa a la columna.
15. Centrifugar a **máx. vel.** por **1 min.** a T° ambiente.
16. Remover y descartar la columna. Guardar el ADN a -20°C o menos.

---

## ANEXO 2:

### Protocolo de purificación de bandas de ADN (*GenElute™ Minus EtBr Spin Column* de Sigma)

1. Poner la columna en el tubo de microcentrífuga.
2. Pre-lavar la columna agregando **100µL** de *buffer* TE 1x o agua estéril.
3. Centrifugar a máxima velocidad en la microcentrífuga durante 5-10 segundos.

*Nota: La columna no puede quedar seca (no se debe realizar el procedimiento con mucha anticipación ni centrifugar más de 10 segundos).*

4. Descartar la solución de lavado o transferir la columna a un nuevo tubo de colección.
5. Cortar la banda de interés del gel de agarosa y agregar a la columna pre-lavada (cortar lo más cercano posible a la banda de ADN para eliminar el exceso de agarosa y obtener un ADN más concentrado), el gel puede ser fragmentado para mejorar la purificación.
6. Centrifugar la columna a máxima velocidad durante 10 minutos. El ADN purificado queda en el tubo de colección listo para usar o ser guardado a -20°C.